

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**



**TESIS DOCTORAL**

**Estudio de la expresión diferencial de proteínas de bacterias  
periodontales mediante herramientas proteómicas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

**Potupa Oksana**

DIRECTORES

**Mariano Sanz Alonso**

**Elena Figuera Ruiz**

Madrid

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



**TESIS DOCTORAL**

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS DE  
BACTERIAS PERIODONTALES MEDIANTE HERRAMIENTAS  
PROTEÓMICAS

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA  
PRESENTADA POR

**Potupa Oksana**

Directores

Mariano Sanz Alonso

Elena Figuro Ruiz

*The way people come into your life when you need them,  
it's wonderful and it happens in so many ways. It's like  
having an Angel. Somebody comes along and helps you  
get right*

Stevie Ray Vaughan

*To Prof. Niklaus Lang,  
Thank you for being my Angel!*



## Agradecimientos

En primer lugar me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a mi director de tesis, el Profesor Mariano Sanz, por el continuo apoyo durante mi estancia en Madrid, por su paciencia, motivación, ilusión e inmenso conocimiento. No podría haber imaginado tener un mejor director y mentor para mi doctorado.

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a mi directora, la Profesora Elena Figuero, nunca he conocido a una persona como tú, inteligente, trabajadora, hermosa y con muy buen corazón. Gracias por toda la paciencia que tuviste conmigo, por la motivación, por el apoyo y por todas las noches de insomnio que tuviste por mi culpa.

Al Profesor David Herrera, por sus precisas aportaciones y recomendaciones.

A la Dra. Arancha Llama Palacios, por todo el apoyo, por tus consejos, por el conocimiento y la paciencia, por todos los momentos que compartimos, trabajando, riendo y hasta llorando.

Quiero agradecer a la Dra. María Sánchez, Ana O'Connor, Marta García y Dra. María José Marín por su amistad, apoyo y corazón abierto desde mi primer día en la UCM.

Quiero decir gracias a mis amigos de la familia UCM, a Leire Virto, Patricia Romero, Patricia Bermejo, Myroslav Solonko, Honorato Vidal... Hemos pasado gran parte de nuestra vida juntos, trabajando, estudiando, viajando e incluso de fiesta. No quiero que suene como un adiós, ya que es solo el comienzo de nuestro camino juntos, estoy segura de que vamos a ser capaces de ver los éxitos uno de otro y compartir los momentos de felicidad juntos. Honorato, estoy muy feliz de poder compartir este día tan especial contigo, debido a la situación actual estamos tan lejos, pero este momento es increíble. ¡Lo conseguimos!

*I want to thank to Myron Uhryn and Roman Schelling, that were with me from the beginning of my path, all this would not be possible without you.*

Quiero agradecer a mis padres, no tengo palabras para agradecerlos lo que habéis hecho por mí, no solo estos años, sino toda la vida. Soy la persona más afortunada del mundo por tenerlos como mis padres. ¡Mamá, papá, os quiero mucho!

*And last, but not least, I would like to thank Prof. Niklaus Lang, whom I am dedicating this thesis to. You have changed my life since you appeared in it, thank you for all your care, for your belief in me, for all your support. I'm living my life the way I do now, because you are in it.*

Gracias a todos.



## Índice

<b>Resumen .....</b>	<b>11</b>
<b>Summary .....</b>	<b>13</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>16</b>
<b>I. Las enfermedades periodontales .....</b>	<b>16</b>
<b>II. Biofilm o biopelícula dental .....</b>	<b>17</b>
1. Concepto.....	17
2. Estructura, formación y desarrollo de la biopelícula.....	18
3. Ventajas de la biopelícula frente al estado planctónico.....	20
<b>III. <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>.....</b>	<b>21</b>
1. Clasificación .....	21
2. Características .....	22
3. Factores de virulencia .....	23
4. Importancia de <i>A.actinomycetemcomitans</i> en las enfermedades periodontales .....	25
<b>IV. <i>Fusobacterium nucleatum</i>.....</b>	<b>25</b>
1. Clasificación .....	25
3. Factores de virulencia .....	27
4. Importancia de <i>F. nucleatum</i> en las enfermedades periodontales.....	29
<b>V. <i>Porphyromonas gingivalis</i>.....</b>	<b>30</b>
1. Clasificación .....	30
2. Características .....	30
3. Factores de virulencia .....	31
4. Importancia de <i>P. gingivalis</i> en las enfermedades periodontales .....	33
<b>Justificación, objetivos e hipótesis .....</b>	<b>35</b>
<b>I. Justificación.....</b>	<b>35</b>
<b>II. Objetivos.....</b>	<b>36</b>
Objetivo general .....	36
Objetivos específicos.....	36
<b>III. Hipótesis .....</b>	<b>37</b>
Hipótesis general .....	37
Hipótesis específica .....	37
<b>Material y métodos .....</b>	<b>39</b>
<b>I. Estudio 1. Estudio de la expresión diferencial de proteínas de A.</b>	
<i>actinomycetemcomitans</i> .....	39

1. Cepa bacteriana y condiciones de cultivo .....	39
2. Extracción de proteínas .....	40
3. Diseño experimental DIGE (Differential in Gel Electrophoresis) .....	41
4. Adquisición de imágenes e análisis de electroforesis en gel diferencial .....	42
5. Identificación de las proteínas.....	43
6. Preparación de la membrana externa, SDS-PAGE e inmunotransferencia (Western blot).....	44
<b>II. Estudio 2: Estudio de la expresión diferencial de proteínas de.....</b>	<b>46</b>
<b><i>F. nucleatum</i> .....</b>	<b>46</b>
1. Cepa bacteriana, condiciones de cultivo, extracción de proteínas.....	46
2. Diseño experimental, adquisición de imágenes e análisis DIGE .....	46
3. Identificación de proteínas.....	46
4. Ensayos enzimáticos .....	47
<b>III. Estudio 3: Estudio de la expresión diferencial de proteínas de .....</b>	<b>49</b>
<b><i>P. gingivalis</i> .....</b>	<b>49</b>
1. Cepa bacteriana, condiciones de cultivo, extracción de proteínas.....	49
2. Digestión y desalación de péptidos .....	50
3. Cromatografía líquida-espectrometría de masas .....	50
4. Identificación de proteínas.....	51
5. Cuantificación de proteína.....	52
<b>Resultados.....</b>	<b>54</b>
<b>I. Estudio 1: Expresión diferencial de proteínas de .....</b>	<b>54</b>
<b><i>A. actinomycetemcomitans</i> .....</b>	<b>54</b>
1. Proteínas expresadas diferencialmente en la biopelícula frente al estado planctónico .....	54
2. Proteínas reprimidas en la biopelícula .....	61
3. Proteínas sobreexpresadas en la biopelícula .....	61
4. Validación de las proteínas .....	61
<b>II. Estudio 2: Expresión diferencial de proteínas de <i>F. nucleatum</i> .....</b>	<b>64</b>
1. Proteínas expresadas diferencialmente en la biopelícula frente al estado planctónico .....	64
2. Proteínas de la vía del butirato con expresión diferencial .....	70
<b>III. Estudio 3: Expresión diferencial de proteínas de <i>P. gingivalis</i>.....</b>	<b>73</b>
1. Proteínas identificadas de <i>P. gingivalis</i> .....	73
2. Proteínas expresadas diferencialmente .....	76

<b>Discusión .....</b>	<b>82</b>
<b><i>I. Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>.....</b>	<b>83</b>
<b><i>II. Fusobacterium nucleatum</i>.....</b>	<b>85</b>
<b><i>III. Porphyromonas gingivalis</i>.....</b>	<b>88</b>
<b>IV. Limitaciones y dificultades de la investigación .....</b>	<b>92</b>
<b>V. Implicaciones de la investigación .....</b>	<b>92</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>94</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>95</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>108</b>
<b>I. Artículo 1 .....</b>	<b>108</b>
<b>II. Artículo 2 .....</b>	<b>118</b>
<b>III. Comité ético.....</b>	<b>131</b>

## **Resumen**

Aunque la mayoría de los microorganismos que colonizan la cavidad bucal son compatibles con la salud periodontal. Hay patobiontes específicos que han mostrado patogenicidad al alterar la tolerancia inmune del huésped, causando una inflamación crónica en los tejidos periodontales que conduce a los cambios destructivos en el tejido conectivo y óseo que caracterizan a la periodontitis. A pesar de que el factor etiológico principal de la periodontitis son los microorganismos que residen en la biopelícula subgingival, sólo un pequeño grupo de bacterias se ha asociado directamente con el inicio y la progresión de esta enfermedad, principalmente las implicadas en el cambio de la microbiota en estado simbiótico al estado disbiótico. La formación de la biopelícula desencadena la expresión de proteínas, en comparación con las células planctónicas.

### **Objetivo:**

Estudiar la expresión diferencial de proteínas de las bacterias periodontales (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*), en la biopelícula frente al estado planctónico, utilizando herramientas proteómicas.

### **Material y métodos:**

Secuencia de tres estudios *in vitro*:

- Estudio 1, de la expresión diferencial de proteínas de *A.actinomycetemcomitans*
- Estudio 2, de la expresión diferencial de proteínas de *F. nucleatum*
- Estudio 3, de la expresión diferencial de proteínas de *P. gingivalis*

Se formaron biopelículas monoespecie de *F. nucleatum* e *A. actinomycetemcomitans* en portaobjetos recubiertos de hidroxiapatita, mientras que la biopelícula de *P. gingivalis* se formó sobre discos de hidroxiapatita. Los cultivos de células planctónicas se obtuvieron inoculando medio BHI (*brain heart infusion*) modificado con la suspensión bacteriana. Las muestras se incubaron en condiciones anaeróbicas a 37°C durante 24 horas (estudio 1 y 2) y 96 horas (estudio 3). Para la extracción de las proteínas, la biopelícula y las células planctónicas se rompieron mediante sonicación. El estudio 1 y 2 se realizó utilizando la tecnología de electroforesis bidimensional con marcaje fluorescente, el estudio 3 se realizó mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas.

**Resultados:**

- **Estudio 1:** 87 proteínas se expresaron diferencialmente durante el crecimiento en la biopelícula, siendo 13 sobreexpresadas y 37 reprimidas.
- **Estudio 2:** 68 proteínas se expresaron diferencialmente durante el crecimiento en la biopelícula, siendo 20 proteínas reprimidas y 31 sobreexpresadas.
- **Estudio 3:** se identificaron 602 proteínas, 565 en estado planctónico y 573 en la biopelícula, con 29 y 37 proteínas exclusivas respectivamente. De estas proteínas, 26 fueron sobreexpresadas y 34 reprimidas.

**Conclusión:**

El proteoma de bacterias periodontales exhibió perfiles de expresión diferencial cuando se cultivaron en la biopelícula.



## Summary

Although the majority of the micro-organisms that colonise the oral cavity and dental surfaces are compatible with periodontal health, there are specific pathobionts that have shown pathogenicity by disrupting the host immune tolerance and causing a chronic unresolved inflammation in the periodontal tissues leading to the destructive changes in the connective and bone tissue metabolism that characterize periodontal disease. Despite the fact that the primary etiological factor of periodontitis are the microorganisms residing in the subgingival biofilm, only a small group of bacteria have been directly associated with initiation and progression of this disease, mainly those involved in the switching symbiotic microbiota into a dysbiotic state. Numerous studies have demonstrated that the biofilm formation triggers the expression of specific sets of proteins, compared to planktonic cells.

**The aim** of this investigation was to study the protein differential expression of periodontal bacteria (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*), when growing in biofilm compared to planktonic state using proteomic tools.

### **Materials and methods:**

Sequence of three *in vitro* studies:

- Study 1, the differential expression of proteins of *A. actinomycetemcomitans*
- Study 2, the differential expression of proteins of *F. nucleatum*
- Study 3, the differential expression of proteins of *P. gingivalis*

Monospecies biofilms of periodontal bacteria *F. nucleatum* and *A. actinomycetemcomitans* were formed on sterile plasma coated hydroxyapatite slides, while the biofilm of *P. gingivalis* was formed on the hydroxyapatite discs. Planktonic cell cultures were obtained by inoculating modified BHI medium with bacteria suspension. All samples were incubated in anaerobic conditions at 37°C during 24 hours (Study 1 and 2) and 96 hours (Study 3). To extract the proteins, biofilm and planktonic cells were disrupted by sonication. The study of differential expression in the study 1 and 2 was performed using Differential in Gel Electrophoresis and in study 3 a label-free quantitative proteomic technique.

**Results:**

- **Study 1:** 87 proteins were differentially expressed during biofilm growth, being 13 over expressed and 37 down expressed
- **Study 2:** 68 proteins were differentially expressed during biofilm growth, being 20 down-expressed and 31 over-expressed
- **Study 3:** 602 total proteins were identified, 565 when *P.gingivals* grew in planktonic state and 573 in biofilm, with 29 and 37 exclusive proteins respectively. Of these proteins 60 were differentially expressed, 26 were up-regulated and 34 down-regulated.

**Conclusion:** proteome of periodontal bacteria exhibited differential expression profiles when grown in biofilm.

# *Introducción*

## **Introducción**

### **I. Las enfermedades periodontales**

Las enfermedades periodontales son procesos infecciosos que afectan a los tejidos de soporte del diente (periodonto). Se clasifican en dos grandes grupos: gingivitis y periodontitis.

La gingivitis se caracteriza por la presencia de signos y síntomas clínicos de inflamación en la encía, sin que se presenten alteraciones en la inserción conectiva del diente, ni en el hueso alveolar (Murakami y cols., 2018).

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica multifactorial, asociada con biopelículas de placa disbiótica y caracterizada por la destrucción progresiva del aparato de soporte del diente, que, si no se trata, provoca la pérdida de dientes, lo que con frecuencia conduce a disfunción masticatoria, deterioro de la estética, y puede derivar en desigualdad social y en un impacto negativo general en la calidad de vida del sujeto que lo padece (Papapanou y cols., 2018). La periodontitis es un problema grave de salud pública debido a su alta prevalencia, ya que afecta al 30-50% de la población adulta (Petersen y Ogawa, 2012) y la periodontitis grave, con una prevalencia global del 11,2%, conlleva una importante carga sanitaria, social y económica (Kassebaum y cols., 2014).

Además, estudios epidemiológicos transversales y prospectivos han demostrado que la periodontitis tiene un impacto potencialmente negativo en la salud general, ya que existe evidencia de su asociación significativa con distintas enfermedades sistémicas, tales como enfermedades cardiovasculares (Genco y Sanz, 2020; Orlandi y cols., 2020), artritis reumatoide (Bartold y Lopez-Oliva, 2020; de Molon y cols., 2019), diabetes (Genco y Borgnakke, 2020; Polak y cols., 2020), etc.

De acuerdo con la “Hipótesis de la placa no específica” se ha aceptado que la gingivitis es inducida por una acumulación de masa de bacterias formando un *biofilm* dental (placa dental), sin embargo, el enfoque etiológico en la periodontitis es mucho más complejo. Tradicionalmente se adscribió un papel etiológico prominente a un grupo de bacterias anaeróbicas específicas, el "complejo rojo" (que incluye *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*) (Socransky y cols., 1998). Posteriormente, los estudios empleando tecnologías moleculares de

identificación bacteriana han demostrado que no solo intervienen este pequeño grupo de patógenos, sino que son muchos los microorganismos involucrados en el desarrollo del biofilm subgingival patogénico, muchos de ellos todavía sin identificar. Además se ha demostrado que el mecanismo patogénico clave es la transformación del *biofilm*, de un estado simbiótico a un estado disbiótico, lo que provoca alteraciones en la relación microbio-huésped suficiente para iniciar el proceso inflamatorio. Según la “*Keystone-Pathogen Hypothesis*” los patógenos microbianos tienen efectos desproporcionadamente grandes en sus comunidades en relación con su abundancia (Hajishengallis y cols., 2012, 2011). Se ha demostrado que *P. gingivalis* puede alterar la inmunidad innata de manera que altera el crecimiento y desarrollo de la biopelícula, provocando un cambio destructivo en la interacción homeostática huésped-microbio (Darveau, 2010).

El diagnóstico de esta fase dinámica de la enfermedad en la que intervienen directamente las interacciones de las bacterias más patógenas con distintos componentes de nuestros mecanismos inflamatorios e inmunes han sido el foco de atención de las investigaciones en los últimos años. Estos estudios moleculares, bioquímicos y fisiológicos permitirán desarrollar nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas para combatir la periodontitis. Entre estas investigaciones, el estudio del proteoma de bacterias específicas creciendo en el biofilm revelará patrones de expresión proteínica, lo que permitirá enfocar dichas estrategias diagnósticas y preventivas.

## **II. *Biofilm* o biopelícula dental**

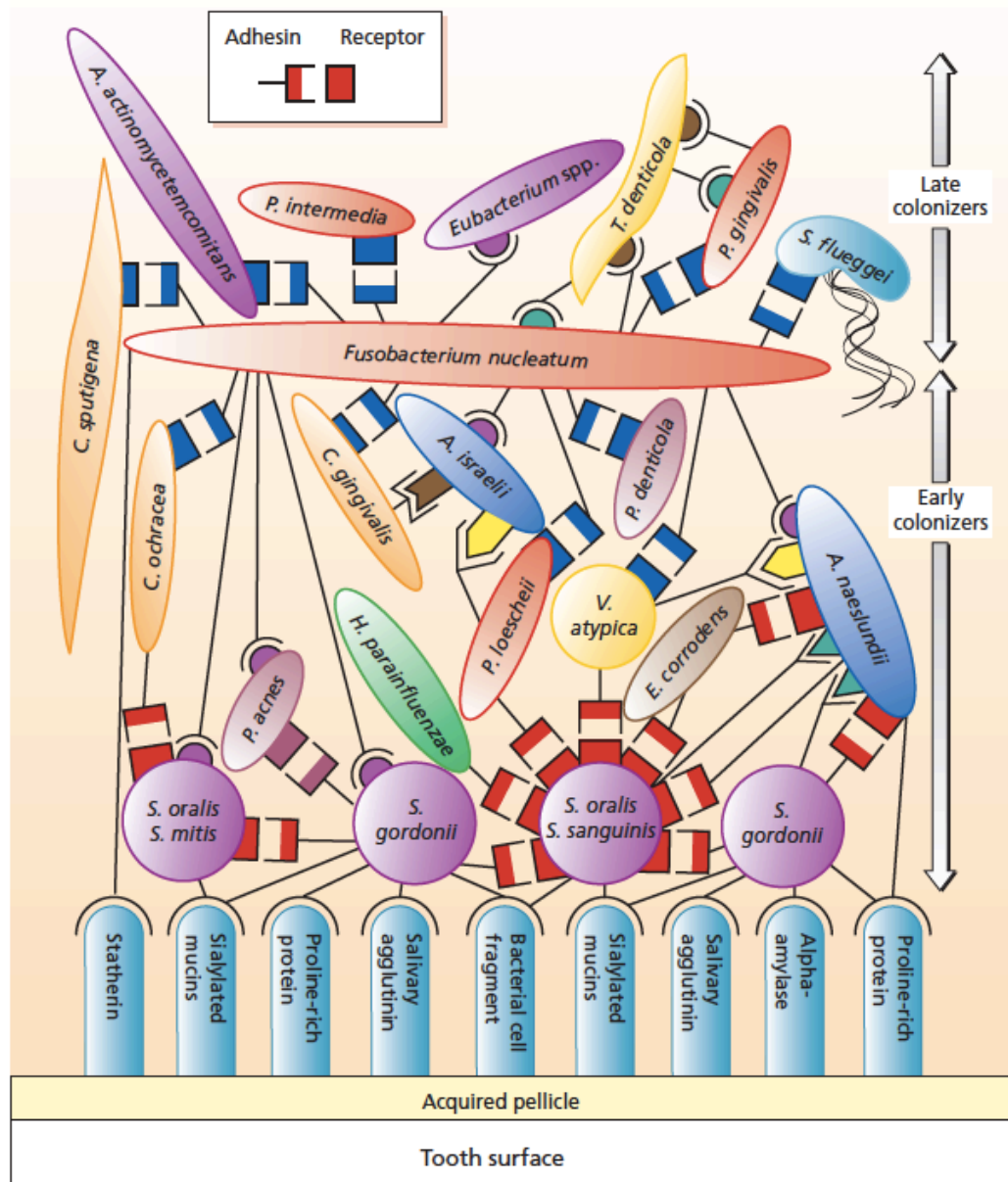
### **1. Concepto**

La microbiota oral representa el 25% de la microbiota humana e incluye más de 700 especies bacterianas diferentes (Dewhirst y cols., 2010). Durante los últimos 100 años, la investigación se ha centrado en estudiar la fase planctónica de las bacterias, pero ahora se sabe que los microorganismos orales no crecen en aislamiento, sino que se organizan como biopelículas. El *biofilm* o biopelícula se ha definido por Costerton y colaboradores como poblaciones microbianas en el interior de una matriz extracelular, a la cual las bacterias se adhieren entre sí, así como a superficies sólidas

en un medio líquido (Donlan y Costerton, 2002). En condiciones de adecuada higiene bucal, la biopelícula dental no alcanza el suficiente volumen y maduración para provocar inflamación y la biopelícula contiene fundamentalmente bacterias simbioses que protegen frente a la colonización de bacterias patogénicas. Sin embargo, cuando estas biopelículas alcanzan una masa de bacterias relevante y su grado de maduración ocasiona importantes cambios ecológicos en su estructura, se produce un sobrecrecimiento de las bacterias más patógenas que desplazan a las bacterias simbioses y son entonces capaces de generar patología. De hecho, las enfermedades bucales más comunes, tales como caries, gingivitis y periodontitis son causadas por biopelículas patógenas (Manji y cols., 2018).

## 2. Estructura, formación y desarrollo de la biopelícula

Los microbios que se encuentran en las biopelículas naturales no se distribuyen al azar, sino que están organizados espacial y funcionalmente, formando una microbiota muy diversa. La formación de la biopelícula podría considerarse como un proceso de diferenciación y desarrollo caracterizado por varias etapas comunes, que incluyen adhesión, agregación, producción de una matriz extracelular y comunicación intercelular. Su desarrollo se inicia por la adherencia de especies bacterianas pioneras, generalmente no patógenas, a las proteínas salivares y a las glicoproteínas adsorbidas en la superficie dentaria (película adquirida), originando una monocapa sobre la superficie y formando, al mismo tiempo, microcolonias. Las células modificarán ahora su comportamiento y darán lugar a la compleja arquitectura de la biopelícula madura, mediante la producción de una matriz de exopolímeros, constituida principalmente por exopolisacáridos, que cementará todo el conjunto y hará que los microbios queden atrapados. Si las condiciones son las adecuadas, la biopelícula se extenderá hacia zonas no colonizadas (Marsh, 2005; Socransky y cols., 1998). La población crecerá y se hará más compleja, lo que traduce cambios en las poblaciones bacterianas predominantes que evolucionan de bacterias gram-positivas, a gram-negativas (Figura 1).



**Figura 1.** Modelo espacio-temporal de colonización bacteriana oral. Comenzando en la parte inferior, los colonizadores primarios se unen a través de adhesinas a los receptores salivales complementarios en la película adquirida que recubre la superficie del diente. Los colonizadores secundarios se unen a bacterias previamente unidas. Adoptado de Kolenbrander et al. 2006.

Los primeros colonizadores (principalmente los estreptococos, por ejemplo, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*) coagregan uno con el otro y con *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*, patógenos periodontales y los colonizadores tardíos de la cavidad oral, se adhieren casi exclusivamente con ayuda de *F. nucleatum* (Kolenbrander y cols., 2006).

### 3. Ventajas de la biopelícula frente al estado planctónico

La gran mayoría de las bacterias en la boca se encuentran adheridas a las superficies formando biopelículas (Costerton y Wilson, 2004). La mayoría de las biopelículas naturales contienen múltiples especies, como se mencionó anteriormente, que participan en una amplia gama de interacciones físicas, metabólicas y moleculares, y se denominan comunidades microbianas. Las bacterias dentro de la comunidad microbiana tienen propiedades radicalmente diferentes después de la fijación a una superficie (Marsh, 2005). Estas propiedades están dirigidas a su supervivencia, aportando beneficios a los organismos participantes e incluyen entre ellos:

- Mejora de las condiciones de crecimiento. Las bacterias no solo pueden preparar el medio ambiente para otras especies (como lo hacen los primeros colonizadores para las posteriores), pero también los consorcios microbianos aumentan su diversidad y eficiencia metabólica, desarrollando las condiciones adecuadas para cada bacteria (van Steenberg y cols., 1984).
- Sinergismo patogénico o, en otras palabras, mayor capacidad para causar patología. Las infecciones polimicrobianas causadas por comunidades bacterianas tienen un curso mucho más grave, ya que las bacterias que flotan individualmente apenas causan patología (van Steenberg y cols., 1984).
- Mayor resistencia. Una consecuencia clínica importante de la organización estructural y funcional de la biopelícula es su menor susceptibilidad a los agentes antimicrobianos, mayor tolerancia al estrés ambiental y las defensas del huésped. Las células bacterianas no solo pueden producir enzimas neutralizantes (Brook, 1989) como  $\beta$ -lactamasa, sino también dar protección física frente a la fagocitosis al encontrarse las células en estratos profundos de consorcios espacialmente organizados (Fux y cols., 2005).



### III. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

#### 1. Clasificación

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* es un microbio oral del género *Aggregatibacter* y miembro de la familia *Pasteurellaceae*. A lo largo de su historia esta bacteria sufriría modificaciones en su nomenclatura. Inicialmente fue conocido como *Bacterium actinomycetemcomitans* luego la nombraron *Bacterium comitans*. Con el paso del tiempo se denominó *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y en la actualidad recibe el nombre de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Nørskov-Lauritsen y Kilian, 2006).

Según Paster y colaboradores, existen 9 phila orales y *A. actinomycescomitans* pertenece al phylum de los *Proteobacteria* y, dentro de él, a la familia *Pasteurellaceae* y, al género *Aggregatibacter*, previamente *Haemophilus* (Paster y cols., 2001).

Basado en la presencia de proteínas capsulares específicas se puede detectar una respuesta individual distinta generada por anticuerpos, lo que permite dividir a *A. actinomycescomitans* en seis serotipos (de la “a” a la “f”). Esta variabilidad genética ha sido asociada a diferentes niveles de virulencia. Se ha propuesto que esta especie puede estar agrupada en tres grandes linajes filogenéticos (Henderson y cols., 2010):

- Cepas del serotipo b
- Cepas del serotipo c
- Cepas de los serotipos a, d, e, y f

La mayoría de los sujetos albergan un único serotipo que permanece estable durante años. De manera ocasional, los individuos están colonizados por dos o tres serotipos (esto es más frecuente en Japón, donde 33% de las localizaciones evaluadas presentan más de un serotipo de *A. actinomycescomitans*) (Rylev y Kilian, 2008).

La distribución global de los distintos serotipos no es homogénea y la asociación entre los distintos serotipos y el estado periodontal puede depender de la localización geográfica y/o la etnia de la población estudiada. Por ejemplo, en España los serotipos predominantes son “a” y “b” (Mínguez y cols., 2014). En una revisión sistemática (Brígido y cols., 2014) en la que se analizan 12 estudios en los que se realiza un análisis mediante PCR en 8 países distintos (Japón, Brasil, Estados Unidos, Indonesia,

Suiza, Alemania, Grecia y Tailandia), concluyó que los serotipos “a”, “b” y “c” son predominantes mundialmente, los serotipos “d” y “e” son poco frecuentes y la prevalencia del recientemente descubierto serotipo “f” es todavía desconocida. En Estados Unidos el serotipo predominante es el “c”. El serotipo “a” es más prevalente que el “b” (Doğan y cols., 2016). Por otra parte, se ha propuesto la existencia de un nuevo serotipo, denominado serotipo “g”, debido a la imposibilidad de tipificarlo dentro de los seis serotipos conocidos “a-f”, que se ha relacionado con una baja actividad citotóxica y alta formación de biofilm (Takada y cols., 2010).

Existe una variante de *A. actinomycetemcomitans* serotipo B denominado como clon JP2, este tipo clonal virulento se ha aislado en individuos de origen africano (Haubek, 2010). Estudios sobre el gen de la leucotoxina han observado que las cepas que poseen una delección en el par de bases 530 en la región promotora del gen operón de la leucotoxina, producen de 10 a 20 veces niveles más altos de leucotoxina (Brogan y cols., 1994). Esta variable está fuertemente relacionada con la pérdida de inserción periodontal (Åberg y cols., 2014).

## 2. Características

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* es un coco-bacilo gram negativo, capnofílico y anaerobio facultativo. Este patógeno requiere CO<sub>2</sub> (5-10%) para su crecimiento. Su tamaño es de 0.4-0.5 µm x 1.0–1.5 µm (Henderson y cols., 2010). Cuando es cultivado en agar, tiene una forma característica de estrella (Figura 2), debido a la pérdida de fimbrias que ocurre en el paso de su forma rugosa a lisa. Esta bacteria es no esporulada, no motil, no hemolítica, catalasa y oxidasa positiva; es sacarolítica y produce enzimas específicas como β-glucuronidasa y β-galactosidasa para la fermentación de los azúcares (Olsen y cols., 1999).



**Figura 2.** Colonia de *A. actinomycetemcomitans*, con la forma característica de estrella. Adoptado de UCL Eastman Dental Institute.

En cuanto a su ultraestructura, *A. actinomycetemcomitans* posee:

- Vesículas superficiales: son estructuras que aparecen en la superficie de la bacteria, de naturaleza lipopolisacárida. Se liberan al medio externo y están relacionadas con la leucotoxicidad de la bacteria, de modo que las cepas leucotóxicas de *A. actinomycetemcomitans* tienen un gran número de vesículas en su membrana externa, mientras que las cepas no-leucotóxicas poseen ninguna o pocas vesículas (Mintz y Fives - Taylor, 1999). Pueden contener leucotoxina, bacteriocinas, colagenasas, adhesinas y endotoxinas (Åberg y cols., 2014).
- Adhesinas: proteínas de la superficie de la célula bacteriana que intervienen en la adhesión (Meyer y Fives-Taylor, 1994).
- Endotoxinas: toxinas con un alto potencial para causar destrucción en las células y los tejidos del huésped pudiendo provocar necrosis de la piel, reabsorción ósea, agregación plaquetaria y activación de los macrófagos (Kiley y Holt, 1980).
- Fimbrias: pequeñas estructuras filamentosas que *A. actinomycetemcomitans* puede presentar en su superficie celular. Están relacionados con la adhesión, agregación y coagregación bacteriana. En su extremo se encuentran las adhesinas. Las colonias fimbriadas tienen una estructura tridimensional en forma de estrella y presentan una capacidad adhesiva 3 o 4 veces superior a las no fimbriadas;
- Pili A: estructura similar a las fimbrias, más pequeña que interviene también en la colonización (Saito y cols., 2010; Smith y cols., 2016).
- Matriz extracelular: material amorfo de origen glicoproteico y con capacidad de producir reabsorción ósea y actividad adhesiva (Mintz y Fives - Taylor, 1999).

### 3. Factores de virulencia

Gran parte de los factores de virulencia de *A. actinomycetemcomitans* están codificados genéticamente, existiendo diferencia en la expresión de estos factores de virulencia entre distintas cepas de la misma especie (Díaz y cols., 2006). Se han descrito diversos factores de virulencia para *A. actinomycetemcomitans*, entre ellos, leucotoxina, fimbria, toxina distensora del citoesqueleto (Cdt), adhesinas epiteliales (Aae) y proteínas de adhesión e invasión celular (Mínguez y cols., 2014).

- Leucotoxina (LTX): causa muerte celular en las células humanas de origen hematopoyético mediante la unión a receptor 1 de la función linfocitaria (LFA-1) y la ruptura de la integridad de membrana. Activa una rápida secreción de enzimas lisosomales y causa apoptosis de los linfocitos. En los monocitos/macrófagos, LTX activa la caspasa-1, proteína de cisteína que causa una respuesta proinflamatoria mediante la activación de la secreción de interleuquina (IL)-1 $\beta$  e IL-18 (Johansson, 2011).
- Toxina distensora del citoesqueleto (Cdt): es una exotoxina que tiene la capacidad de detener el crecimiento de las células, alterar su morfología y producir su muerte. Es una toxina distensora del citoesqueleto que tiene la capacidad de inhibir la producción de citoquinas proinflamatorias e induce la secreción de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e interferón (IFN)- $\gamma$  (Díaz y cols., 2006). La actividad de Cdt varía entre las distintas cepas de *A. actinomycetemcomitans*, esto es debido a que está regulada en una región donde ocurren gran cantidad de polimorfismos, la región cdtABC (Yamano y cols., 2003).
- Factores que facilitan adhesión: *A. actinomycetemcomitans* es capaz de adherirse a células, bacterias, componentes de la membrana extracelular y saliva por medio de fimbrias, pili A, lipopolisacárido (LPS), proteínas de la membrana externa, el polímero extracelular (PGA) y vesículas (Fine y cols., 2006).
- Multiplicación: *A. actinomycetemcomitans* presenta unos mecanismos que le dan ventaja a la hora de obtener nutrientes como son las hemolisinas, las proteinasas (colagenasas), las proteínas reguladoras del hierro y las proteínas periplasmáticas encargadas del transporte del hierro (Fine y cols., 2006).
- Factores que facilitan relación con otras bacterias: *A. actinomycetemcomitans* produce bacteriocinas (actinobacilina) que inhiben el crecimiento de otras especies bacterianas (Hammond y cols., 1987). Por otra parte, estudios indican que esta bacteria produce una regulación en la expresión proteica de otras especies cuando se encuentra en la biopelícula (Bao y cols., 2015).
- Factores que facilitan invasión de tejidos del huésped:  
*A. actinomycetemcomitans* es capaz de penetrar el epitelio e invadir el tejido conectivo gracias a la fosforilcolina, proteínas de la membrana externa como la proteína de membrana externa 100 (OMP 100) (Kieselbach y cols., 2015) y proteínas de unión al receptor de la transferrina y a las integrinas epiteliales (Rudney y cols., 2001).

#### 4. Importancia de *A.actinomycescomitans* en las enfermedades periodontales

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* posee factores de virulencia capaces de provocar daño directo a los tejidos periodontales, así como evadir la respuesta inmune tanto innata como adquirida, favoreciendo la inflamación y destrucción ósea. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ha sido aislada en sujetos con periodontitis en mayor proporción que en sujetos con gingivitis o sujetos sanos y ha sido relacionada clínicamente de manera positiva con una mayor profundidad de sondaje y mayor nivel de inserción clínica (da Silva-Boghossian y cols., 2011). Se ha identificado la presencia subgingival de *A. actinomycetemcomitans* como indicador de riesgo para la aparición de periodontitis, con una odds ratio (OR) de 4.3 (Velden y cols., 2015). Como se ha dicho anteriormente, existen diferencias geográficas y raciales en la prevalencia de *A. actinomycescomitans* y su asociación con una mayor destrucción periodontal (Rylev y Kilian, 2008). Sujetos con el genotipo JP2 de *A.actinomycetemcomitans* presentan un mayor riesgo de desarrollar una pérdida de inserción  $\geq 3\text{mm}$  en un periodo de dos años (riesgo relativo [RR]=7.3), encontrándose una asociación fuerte entre la presencia del genotipo JP2 y la progresión de la pérdida de inserción (OR=14.3) (Åberg y cols., 2014).

A la luz de los datos expuestos podemos afirmar que *A. actinomycetemcomitans* es una bacteria fuertemente asociada a la periodontitis, y su estudio más profundo proporcionará información adicional sobre sus propiedades, lo que a su vez abrirá oportunidades adicionales en diagnóstico y tratamiento.

### **IV. *Fusobacterium nucleatum***

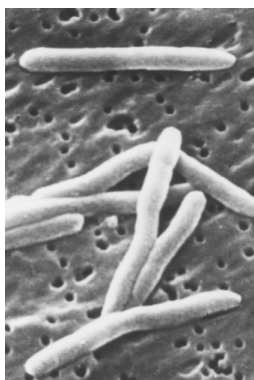
#### 1. Clasificación

*Fusobacterium nucleatum* es una especie bacteriana perteneciente a la familia *Fusobacteriaceae*, la cual, está formada por 9 géneros que incluyen a los *Fusobacterium* y *Leptotrichia*. Dentro del género *Fusobacterium*, se han descrito 13 especies, de las cuales, muchas de ellas (incluyendo *F. nucleatum*) han sido identificadas como patógenos en el ser humano y animales (Citron, 2002). El nombre *Fusobacterium* proviene de “fusos”, que significa huso y “bacterion” pequeño bacilo

o bastón. El término *nucleatum* se origina por la apariencia nucleada que frecuentemente se observa al microscopio. Fue nombrada por primera vez por Knorr en 1922 (Bolstad y cols., 1996). Es considerada una especie altamente heterogénea y dependiendo del patrón de hibridación ADN-ADN y electroforético de deshidrogenasa y reductasa glutamina 2-oxoglutarato, se divide en 5 subespecies: *animalis*, *fusiforme*, *vincentii*, *polymorphum* y *nucleatum*. Recientemente, *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* y *F. nucleatum* subsp. *vincentii* se combinaron como la misma subespecie nombrada *F. nucleatum* subsp. *vincentii* (Kook y cols., 2017).

## 2. Características

*Fusobacterium nucleatum* es una bacteria gram negativa, anaerobia aerotolerante, que puede crecer en un ambiente con un máximo del 6% de oxígeno. En cuanto a su morfología, es un bacilo con un núcleo, largo, ligeramente curvado y con una punta fina que le da la apariencia de huso (Figura 3). Suelen medir entre 5 a 10 µm de ancho. Es una bacteria no mótil y no formadora de esporas (Bolstad y cols., 1996). Generalmente no son fermentativos y la producción de ácido butírico, como principal producto metabólico, permite diferenciarlo de otros patógenos, tales como *Prevotella*, *Porphyromonas* y *Bacteroides* (Signat y cols., 2011).



**Figura 3.** Microscopía electrónica de *F. nucleatum*, adoptado de Bolstad et al. 1996.

*Fusobacterium nucleatum* tiene una membrana externa, característica de las bacterias gram negativas, así como una membrana interna. Ambas membranas están separadas por un espacio periplásmico que contiene una capa de peptidoglicanos. La membrana interna está formada por una bicapa fosfolipídica simétrica con proteínas y fosfolípidos en igualdad de cantidad. Por otro lado, la membrana externa, es asimétrica y contiene fosfolípidos, lipoposacaridos, proteínas y lipoproteínas. Dada la

gran cantidad de proteínas que tiene en su membrana externa, se sabe que un tercio del peso de esta bacteria es por la cantidad de proteínas presentes. Estas proteínas de la membrana externa (OMP, por las siglas en inglés, *outer membrane proteins*) son las que le confieren patogenicidad a esta especie. Es una de las pocas bacterias que utiliza el catabolismo de aminoácidos para crear energía. Así mismo también usa glutamato y aspartato, no usando la glucosa como su mayor o principal fuente de energía. De hecho, se ha visto que utiliza la glucosa como biosíntesis de moléculas intercelulares y no para metabolismo energético (V y Hb, 1986).

### 3. Factores de virulencia

*Fusobacterium nucleatum* posee factores de virulencia relacionados con los siguientes aspectos:

- Adhesión sobre las superficies disponibles (co-agregación). La localización principal de la colonización de *F. nucleatum*, es la cavidad oral. Esta especie bacteriana participa en la adhesión y co-agregación de la biopelícula bacteriana, interactuando con otros patógenos, actuando como “puente” y es considerada como la especie con quien más especies bacterianas co-agrega (Kolenbrander y cols., 2006). Este patógeno presenta diversas proteínas de membrana tales como la proteína porina de membrana externa mayor (FomA) y la adhesina A de *Fusobacterium* (FadA) (Han y cols., 2005). Esta última juega un papel importante en la adhesión bacteriana e invasión de las células del huésped. La adhesina A de *Fusobacterium* se presenta en dos formas: la pre-FadA no secretada y la FadA madura secretada, la cual es fácilmente separada de este patógeno. La presencia de ambas es necesaria para la adhesión e invasión en las células del huésped (Xu y cols., 2007). Liu y cols., en el 2014, evaluaron la prevalencia de *F. nucleatum* y la FadA en las muestras de placa subgingival en pacientes con gingivitis con ortodoncia, gingivitis sin ortodoncia, periodontitis y pacientes periodontalmente sanos. Los resultados demostraron una correlación positiva entre la prevalencia de *F. nucleatum*/FdaA y la inflamación gingival (Liu y cols., 2014). *Fusobacterium nucleatum* contiene hemaglutininas, que son por definición, adhesinas, y hace posible que esta bacteria se una a células epiteliales, colágeno, fibroblastos gingivales, eritrocitos e incluso a leucocitos polimorfonucleares (PMN). Además, los LPS de *F. nucleatum* se adhieren a la

película adquirida de la superficie del diente, incluyendo cemento radicular (Han, 2015).

- Sinergismo con otras especies. *Fusobacterium nucleatum* es la especie clave para la interacción entre bacterias gram positivas y gram negativas y además contribuye a las condiciones necesarias para que las bacterias anaerobias, colonizadores secundarios o tardíos, se unan al biofilm. Por ello, se considera un colonizador intermedio a modo de puente que une los colonizadores primarios con los tardíos (Kolenbrander y cols., 2006), de hecho se ha visto que estos colonizadores tardíos casi con exclusividad, solo se coagregan con *F. nucleatum*. Se han demostrado coagregaciones intergenéricas y multigenéricas, tales como con *P. gingivalis* y sinergia con *Tannerella forsythia*. La unión a *F. nucleatum* se debe a las OMP de superficie, concretamente a moléculas de adhesión tipo lectina y no lectina. La unión a los colonizadores tempranos, tales como *Streptococcus sanguis* se debe a dos receptores, que darán lugar a diferentes tipos de configuración estructural, uno mediante proteínas ácido-lipopoteicas y el otro por la unión a otra OMP de membrana (Sharma y cols., 2005).
- Evasión de las defensas del huésped. La capacidad de adhesión y de invasión celular de *F. nucleatum* es uno de los principales mecanismos de evasión de las defensas del huésped y se ha demostrado que esta especie bacteriana es capaz de invadir las células epiteliales. En el 2010, Ji y colaboradores compararon la capacidad de invasión de este patógeno y otras 7 especies bacterianas mediante microscopía confocal y citometría de flujo. Los resultados demostraron que *F. nucleatum* era el patógeno con mayor capacidad de invasión, aunque también encontraron que *F. nucleatum* no pudo sobrevivir en las células epiteliales gingivales y no indujo algún efecto citopático en las células del huésped (Ji y cols., 2010). A la hora de evadir las defensas del huésped *F. nucleatum* produce enzimas proteolíticas, que inhiben péptidos antimicrobianos del huésped (Signat y cols., 2011). Se ha visto en un estudio *in vitro* que es capaz de unirse a la membrana basal, así como al colágeno tipo 4, siendo este el mecanismo que le ayudaría a la invasión del tejido gingival (Reyes y cols., 2013).
- Daño directo e indirecto. Añadido a todos los factores previos, *F. nucleatum* es capaz de producir daño directo e indirecto sobre las células del huésped mediante la producción de diferentes toxinas, tales como ácido butírico,



propionato e iones amonio. Estos componentes tienen la habilidad de lisar o detener la proliferación de células periodontales, como la inhibición de la proliferación de fibroblastos (Abe, 2012) y su concentración está asociada con medidas clínicas de gravedad de la enfermedad (profundidad del sondaje, nivel de inserción clínica, % de sitios que sangran al sondear) y con la carga microbiana total, al mismo tiempo, están por debajo de los límites de detección en sitios sanos (Niederman y cols., 2016). *Fusobacterium nucleatum* induce también la secreción de enzimas proteolíticas, incluyendo metaloproteinasas (MMPs) que modifican la reacción inflamatoria y facilitan migración celular. Se ha visto que esta bacteria es un potente inductor de la producción de colagenasa 3 (MMP-13) (Uitto y cols., 2005). Adicionalmente, *F. nucleatum* tiene la capacidad de estimular diferentes tipos de células, que conducen a la secreción de diferentes mediadores pro-inflamatorios tales como IL-1 $\beta$ , IL-6 y factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$  (Grenier y Grignon, 2006).

#### 4. Importancia de *F. nucleatum* en las enfermedades periodontales

*Fusobacterium nucleatum* es una bacteria comensal que juega un papel importante en las enfermedades periodontales; forma parte del denominado “complejo naranja” como describió Socransky en 1998 (Socransky y cols., 1998). Es un patógeno clave en la formación de la biopelícula, ya que es muy abundante y tiene facilidad y mecanismos para coagregarse con diferentes especies. *Fusobacterium nucleatum* es uno de los anaerobios más abundantes en el área subgingival y puede encontrarse tanto en sitios periodontalmente sanos como en sitios con enfermedades periodontales (Park y cols., 2015). Las subespecies *F. nucleatum* spp *fusfirme* y *F. nucleatum* spp *vincentii* se ha visto que están más frecuentemente asociados a salud periodontal, sin embargo las subespecies *F. nucleatum* spp *nucleatum* o *polyporphum* son las que están más relacionados con la enfermedad (Lourenço y cols., 2014).

*Fusobacterium nucleatum* es uno de los patógenos más relacionados con la gingivitis (Kistler y cols., 2013). La prevalencia de *F. nucleatum* aumenta en concordancia con la severidad de la inflamación y la profundidad de sondaje (Moore y Moore, 1994; Yang y cols., 2014). En estudios donde se comparaban pacientes periodontalmente sanos y con periodontitis, se observa que, tanto en sanos como en enfermos, se detectaban niveles de *F. nucleatum*, sin embargo el recuento era mayor

en pacientes con periodontitis (Park y cols., 2015) y además la proporción de este patógeno fue significativamente mayor en la biopelícula subgingival que en la supragingival (Yang y cols., 2014).

## ***V. Porphyromonas gingivalis***

### **1. Clasificación**

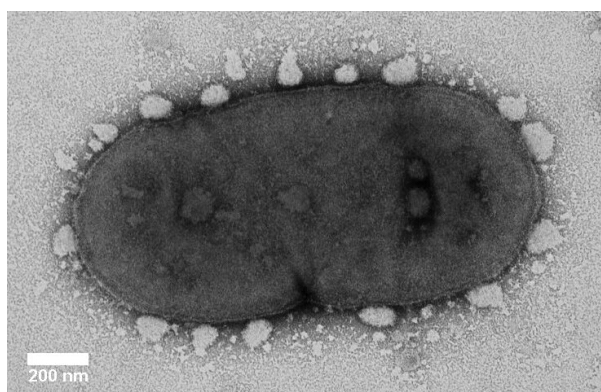
Inicialmente, en las primeras décadas del siglo anterior, *P. gingivalis* y los organismos de este grupo fueron considerados como una especie denominada *Bacteroides melaninogenicum*. En 1970 se descubrió que varias especies de *Bacteroides* mostraban un comportamiento diferente dependiendo del metabolismo de los carbohidratos. Algunas de estas especies eran asacarolíticas (*Bacteroides gingivalis*), otros mostraron un nivel intermedio de fermentación de carbohidratos (*Bacteroides intermedius*) y otras especies eran altamente sacarolíticas (*Bacteroides melaninogenicus*). En 1990 las especies sacarolíticas pigmentadas y no pigmentadas de *Bacteroides* se agruparon en el género *Prevotella*, mientras las especies asacarolíticas en el género *Porphyromonas* (Paster y cols., 2001) por lo que *Bacteroides gingivalis* fue nombrado *Porphyromonas gingivalis*. Actualmente el nombre del género es *Porphyromonas*, y el epíteto específico es *gingivalis*, perteneciente al *Phylum Bacteroidetes*.

### **2. Características**

Son bacilos anaerobios estrictos, gramnegativos asacarolíticos e inmóviles, que miden de 1-3,5µm por 0,5-0,8µm, cuya morfología varía entre cocoide y bacilar corta (Figura 3) (Lamont y Jenkinson, 1998). Cuando se cultiva en un medio de agar sangre, las colonias son inicialmente blancas y tras 4-8 días adquieren el color oscuro que las caracteriza, producto de la producción de pigmentos del tipo porfirinas.

El crecimiento estable de *P. gingivalis* se produce ante un pH comprendido entre 7.5 y 8.5, sin embargo, pueden crecer en ambientes con un pH elevado. *Porphyromonas gingivalis* es capaz de utilizar un amplio número de compuestos que contienen hemina (hemoglobina, miohemoglobina, hemopexina, metahemoglobina,

oxihemoglobina y citocromo C) así como fuentes de hierro no hemínicas (hierro férrico, ferroso inorgánico y transferrina) además de ser capaz de almacenar hemina en su superficie, dándole la coloración característica (Genco, 1995). *Porphyromonas gingivalis* es un microorganismo altamente proteolítico que obtiene el hierro para nutrirse de la degradación proteica de la hemoglobina mediante la utilización de las enzimas endopeptidasas llamadas gingipaínas, generando como productos de fermentación el ácido acético, propiónico, isobutírico, isovalínico, succínico y fenilacético.



**Figura 4.** Microscopía electrónica de *P. gingivalis*, adoptado de Bacmap Genome Atlas

Ultraestructuralmente presenta una cápsula con potencial antigénico, lo que permite diferenciar esta bacteria en 6 serotipos. Además de la cápsula presenta una membrana externa, un LPS y fimbrias, para las cuales también se han descrito 6 genotipos diferentes (Cugini y cols., 2013).

### 3. Factores de virulencia

*Porphyromonas gingivalis* presenta los siguientes factores de virulencia:

- Adhesión y colonización de tejidos del huésped.

*Cápsula:* participa principalmente en la adhesión de tejidos y la modulación de la respuesta del huésped. En la literatura se han descrito seis serotipos capsulares diferentes (K1-K6) y se demostró que esta diferencia en la composición del antígeno estaba relacionada con una patogenicidad diferente, siendo el serotipo K1 y K2 significativamente asociados con los pacientes con periodontitis (Laine y cols., 1997). El aumento de la eficacia de la invasión de serotipos capsulares fue confirmada también en experimentos *in vitro* con fibroblastos gingivales (Irshad y cols., 2012). Adicionalmente, estudios preclínicos *in vivo*, utilizando el modelo de

ratones, corroboraron la acción inmunomoduladora de los serotipos capsulares en comparación con los no capsulares, demostrando que las primeras podían reducir la síntesis de citoquinas IL-1, IL-6 y IL-8 (Brunner y cols., 2010) así como regular la fagocitosis, permitiendo la supervivencia de *P. gingivalis* dentro de tejidos del huésped (Singh y cols., 2011).

*Fimbrias*: son los principales determinantes de adhesión. Gracias a ellos, *P. gingivalis* es capaz de unirse a células epiteliales, fibroblastos, macromoléculas en la saliva, hemoglobina, matriz extracelular e incluso a otras bacterias (Feng y Weinberg, 2006). El gen que codifica estas proteínas es el gen *fimA*, para el cual se han identificado 6 variantes (tipo I, Ib, II, III, IV y V). Se ha relacionado la progresión de la enfermedad con las variantes Ib, II y IV, a la vez que se ha relacionado con salud las cepas tipo *fimA* I y V (Fabrizi y cols., 2013).

- Daño directo e indirecto.

*Gingipainas*: representan aproximadamente el 85% de la actividad proteolítica asociada a *P. gingivalis*. Estas proteasas presentan dos tipos específicos de proteinasas, Arg-gingipaina (RgpA, RgpB) y Lys-gingipaina (Kgp) y están involucrados principalmente en la degradación de los tejidos periodontales y en el daño a las células del huésped. Gingipainas R están vinculados a la destrucción directa de componentes periodontales extracelulares como el colágeno, proteínas inmunes solubles (Cs e Igs) y activación de MMPs (de Diego y cols., 2014; Imamura, 2003). Este patrón destructivo está respaldado por una clara asociación entre estas proteasas específicas y la destrucción directa del soporte periodontal (Wilensky y cols., 2013).

*Lipopolisacárido (LPS)*: desempeña un papel importante en la activación de citoquinas proinflamatorias a través del compromiso con receptor de tipo toll (TLR, por sus siglas en inglés, *toll-like receptors*) 2 y 4. Un estudio *in vitro* reciente evaluó el papel de LPS y ha sugerido un papel proinflamatorio de este factor de virulencia relacionado con la inhibición de la sialoproteína ósea y el aumento de la expresión de IL-8 (Zhang y cols., 2019). Un notable número de investigaciones se centra en la parte biológica activa de LPS, el lípido A, que es el metabolito que interactúa directamente con receptores específicos tipo toll (TLR, por sus siglas en inglés, *toll-like receptors*). Estas investigaciones han demostrado que el LPS de *P. gingivalis* provoca la parálisis de quimioquinas induciendo una alteración del reclutamiento de

células fagocíticas que a su vez permitirá que el patógeno induzca una disbiosis (Darveau, 2010).

- Sinergismo con otras especies.

*Porphyromonas gingivalis* es capaz de coagregarse con otras especies bacterianas como *Tannerella forsythia* o *Treponema denticola*, con las que constituye el complejo rojo. Además se han descrito asociaciones con *A. naeslundii*, *S. gordonii*, *S. mitis*, *S. salivarius* y con la bacteria nexa *F. nucleatum* (Holt y Ebersole, 2005).

#### 4. Importancia de *P. gingivalis* en las enfermedades periodontales

Slots y colaboradores en 1977 postularon que el inicio de periodontitis iba acompañado de un cambio en el ecosistema bacteriano oral, pasando de una flora asociada a salud, compuesta por bacterias gram positivas, sacarolíticas y facultativas, a una flora patógena consistente en bacterias gramnegativas y fundamentalmente anaerobias estrictas (Slots, 1977; Socransky y cols., 1998). *Porphyromonas gingivalis* se encuentra dentro del grupo de bacterias de asociación fuerte con la progresión de la periodontitis (complejo rojo), lo cual se asocia a su aumento en localizaciones con bolsas periodontales y en la parte profunda de las mismas, así en aquellas con más sangrado al sondaje. Esta bacteria se encuentra dentro del grupo de colonizadores tardíos considerado de asociación fuerte con la enfermedad (complejo rojo), junto a *T. forsythia* y *T. denticola*. Al analizar la relación entre los individuos y su flora bacteriana, se observó que los pacientes portadores de *P. gingivalis* aislada o junto a las otras dos especies del complejo rojo, presentaban las profundidades de sondaje medias más altas. Estos pacientes también mostraron una asociación mayor al sangrado al sondaje.

La frecuencia de detección de *P. gingivalis* alcanza un 80% en los pacientes con periodontitis, siendo sensiblemente menor en los casos de gingivitis (40% en cultivo y 30% en reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y mucho menor en pacientes sanos (20% en cultivo y 13,3% con PCR)) (Lau y cols., 2004).

En un estudio realizado sobre muestras de 6,308 pacientes, analizadas con PCR, se observó un aumento de la prevalencia de *P. gingivalis* conforme aumentaba la profundidad de sondaje (Loozen y cols., 2014). Se ha relacionado especialmente la presencia de *P. gingivalis* con pérdida ósea alveolar (Pradhan-Palikhe y cols., 2013).

*Justificación,  
objetivos e hipótesis*

## **Justificación, objetivos e hipótesis**

### **I. Justificación**

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica multifactorial asociada con biopelícula disbiótica y caracterizada por la destrucción progresiva del aparato de soporte de los dientes. Las tres bacterias *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum* y *P. gingivalis* han sido asociadas como patógenos periodontales, desempeñando un importante papel etiológico en el inicio y progresión de la periodontitis.

Cuando las bacterias adquieren un modo de crecimiento en biopelícula, los microorganismos muestran una mayor virulencia, un aumento en la resistencia a compuestos antimicrobianos y una mayor respuesta al estrés ambiental, lo que puede alterar los mecanismos de respuesta inmunológica del huésped. Además, existe evidencia científica sobre el distinto comportamiento de bacterias de la misma especie, sobre todo en cuanto a su expresión proteica, dependiendo que su crecimiento se desarrolle en forma planctónica o formando la biopelícula. Sin embargo, existen muy escasas investigaciones de proteomas diferenciales (biopelícula versus planctónico) en bacterias orales.

Por lo tanto, sería interesante el estudio de las proteínas que se expresan diferencialmente cuando las principales bacterias periodontopatogénicas forman biopelícula. Estos hallazgos facilitarían la búsqueda de posibles dianas tanto preventivas como terapéuticas, si se permite inhibir o bloquear la incorporación de bacterianas patógenas a la placa bacteriana.

## II. Objetivos

### Objetivo general

Analizar la expresión diferencial de proteínas de determinadas bacterias orales relacionadas con la periodontitis (*A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*) de un modo independiente cuando están formando biofilm, comparándolas con su crecimiento en estado planctónico, así como determinar posibles factores de virulencia.

### Objetivos específicos

- Analizar qué grupos funcionales de proteínas de *A. actinomycetemcomitans* tienen tendencia de sobreexpresarse y de ser reprimidos (estudio 1)
- Analizar qué grupos funcionales de proteínas de *F. nucleatum* tienen tendencia de sobreexpresarse y de ser reprimidos (estudio 2)
- Analizar qué grupos funcionales de proteínas de *P. gingivalis* tienen tendencia de sobreexpresarse y de ser reprimidos (estudio 3)



### III. Hipótesis

#### Hipótesis general

Las bacterias periodontales presentan un diferente perfil de expresión proteico en función de su estado de crecimiento (biofilm y planctónico).

#### Hipótesis específica

- *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* presenta diferentes grupos funcionales de proteínas que se sobreexpresan y que se reprimen en función de su estado de crecimiento (estudio 1)
- *Fusobacterium nucleatum* presenta diferentes grupos funcionales de proteínas que se sobreexpresan y que se reprimen en función de su estado de crecimiento (estudio 2)
- *Porphyromonas gingivalis* presenta diferentes grupos funcionales de proteínas que se sobreexpresan y que se reprimen en función de su estado de crecimiento (estudio 3)

# *Material y métodos*

## **Material y métodos**

La tesis doctoral consta de tres estudios independientes, realizados en tres bacterias orales relacionadas con la periodontitis (*A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*). Dos de esos estudios están publicados (anexo, artículos 1 y 2) y el tercero está en fase de publicación.

### **I. Estudio 1. Estudio de la expresión diferencial de proteínas de *A. actinomycetemcomitans***

#### **1. Cepa bacteriana y condiciones de cultivo**

Una cepa de referencia estándar de *A. actinomycetemcomitans* (DSMZ 8324) fue seleccionada y cultivada en placas de agar sangre (Blood Agar Oxoid No 2; Oxoid, Basingstoke, UK), suplementada con 5% (v/v) sangre de caballo estéril (Oxoid), 5,0 mg/L hemina (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) y 1,0 mg/L menadiona (Merck, Darmstadt, Alemania) en condiciones anaeróbicas (10% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, y N<sub>2</sub>) a 37 ° C durante 24-72h. A continuación, se transfirió a medio BHI (*brain-heart infusion*) (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) suplementada con 2,5 g/L mucina (Oxoid), 1,0 g/L extracto de levadura (Oxoid), 0,1 g/L cysteina (Sigma), 2,0 g/L bicarbonato de sodio (Merck), 5,0 mg/L hemina (Sigma), 1,0 mg/L menadiona (Merck) y 0,25% (v/v) ácido glutámico (Sigma), hasta llegar a una fase de crecimiento exponencial.

Los cultivos de células planctónicas se obtuvieron inoculando 30 mL del medio BHI modificado con suspensión bacteriana en tubo de plástico estéril de 50 mL hasta alcanzar 10<sup>7</sup> unidades formadoras de colonias (UFC)/mL e incubadas a 37°C durante 24 h en condiciones anaeróbicas.

El biofilm se formó en portaobjetos de hidroxiapatita (HAP) (7,5 cm x 2,5 cm) (Clarkson Chromatography Products, Williamsport, PA, EE.UU.) sumergido en 100 mL de medio BHI modificado con la misma suspensión de bacterias que contiene 10<sup>7</sup> UFC/mL en una placa Petri de 140 mm y se incubó a 37°C durante 24 h en condiciones anaeróbicas.

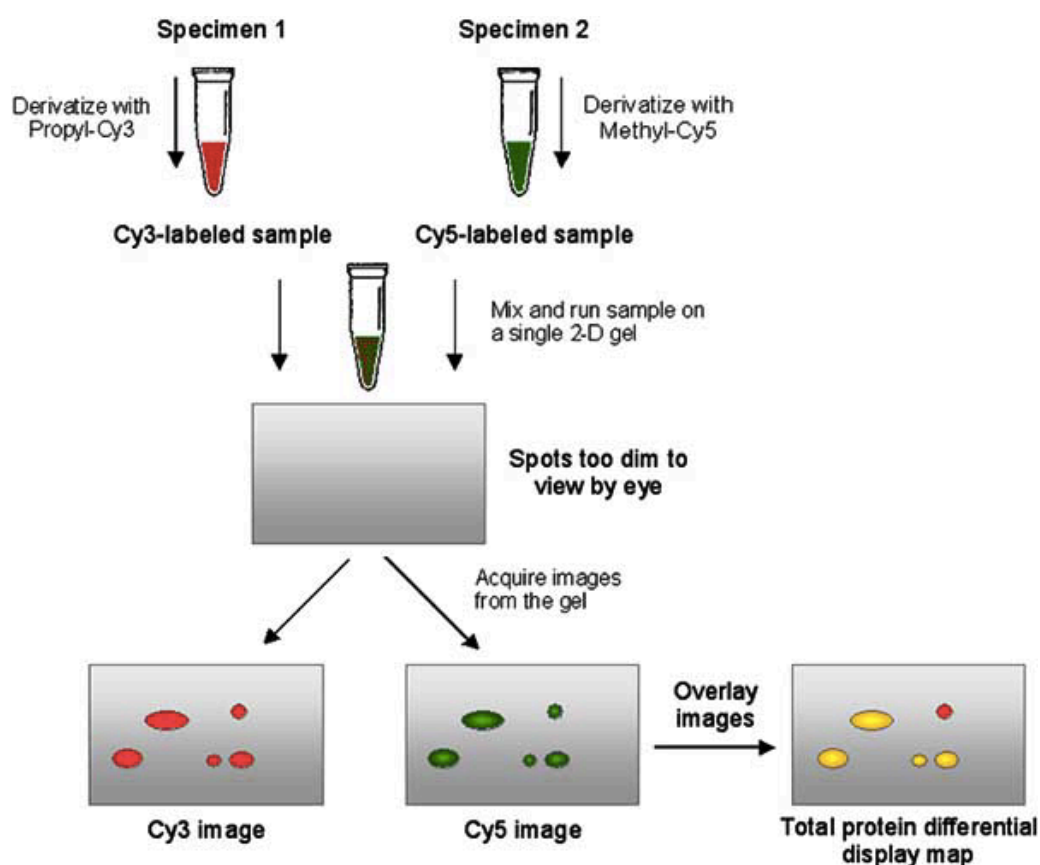
## 2. Extracción de proteínas

Para extraer las proteínas totales de la biopelícula, se rasparon los portaobjetos y las células se dispersaron en 1 mL de PBS (*phosphate buffered saline*), luego las bacterias se recuperaron por centrifugación. Los sedimentos celulares se mantuvieron congelados hasta la preparación de la muestra. Para extraer las proteínas totales de las células planctónicas se centrifugó el cultivo bacteriano (aproximadamente 30 mL) y se mantuvo el sedimento congelado hasta la preparación de la muestra. En ambos casos, los sedimentos se resuspendieron en tampón PBS que contiene 100 mM DTT (*Dithiothreitol*) (GE Healthcare, Uppsala, Suecia), 0,5 mM PMSF (*Phenylmethylsulfonyl fluoride*) (Sigma), 1x cóctel inhibidor de proteasas (Roche, Mannheim, Alemania) y mezcla de nucleasas (GE Healthcare). Las células de la biopelícula y del estado planctónico se rompieron usando un sonicador de punta Labsonic® (B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Alemania) con 20 ciclos de 10 s cada uno (100% de amplitud ultrasónica). Para evitar el sobrecalentamiento, las muestras se mantuvieron en hielo durante el proceso de sonicación. Luego, se centrifugaron para eliminar las células intactas y los desechos residuales.

Cuatro muestras agrupadas de la biopelícula y del estado planctónico se procesaron para los experimentos proteómicos. Cada grupo correspondió a una réplica biológica y se procesó de la misma manera. Las proteínas se precipitaron con TCA (ácido tricloroacético) (Sigma) al 10% (p / v) mediante incubación en hielo 3 h. Luego, las proteínas precipitadas se recuperaron por centrifugación (9000 rpm, 10 min, 4°C), se limpiaron con el tampón de lavado de la 2DClean Kit™ (GE Healthcare), y se resuspendieron en un tampón de solubilización que consiste de 25 mM Tris (GE Healthcare), 7 M urea (GE Healthcare), 2 M thiourea (GE Healthcare) y 4% (p/v) CHAPS (GE Healthcare). Las proteínas se solubilizaron mediante agitación con vórtex durante 3h a temperatura ambiente y mediante sonicación en el baño ultrasónico (Branson 1510 Ultrasonic Cleaner, Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, EE. UU), cuatro veces durante 5 min. Las muestras se mantuvieron en hielo entre los intervalos de tiempo. La concentración de proteína se determinó usando 2D-Quant Kit™ (GE Healthcare). El pH de la muestra se ajustó luego a pH 8,5 en preparación para etiquetado CyDye.

### 3. Diseño experimental DIGE (Differential in Gel Electrophoresis)

Cuatrocientos pmol de CyDye en 1  $\mu$ L de anhidro N,N-Dimetilformamida (DMF) (Sigma) fue utilizado por 50  $\mu$ g de proteína para el etiquetado. Después de 30 min de incubación en hielo en oscuridad, la reacción se detuvo con 10 mM lisina (Sigma) e incubada durante 10 min. En estos experimentos, las muestras de la biopelícula y las células planctónicas se marcaron con Cy3 o Cy5, para evitar cualquier posible sesgo derivado de la eficiencia del etiquetado, la mitad de las muestras de cada condición fueron etiquetadas con tinte Cy3 y la otra mitad con tinte Cy5. El tinte Cy2 se utilizó para etiquetar la muestra de patrón interno. Las muestras se combinaron de acuerdo con el diseño experimental. Un volumen igual de 2x tampón de muestra (8 M urea, 4% (w/v) CHAPS, 130 mM DTT, 2% pharmalytes pH 3-11 NL (GE Healthcare)) fue agregado para la carga de la taza (Baggerman y cols., 2005) (Figura 5).



**Figura 5.** Diagrama esquemático de un análisis 2D-DIGE. Adoptado de Baggerman et al. 2005

El 2-DE se realizó utilizando reactivos y equipos de GE Healthcare. El enfoque isoelectrico de primera dimension (IEF) se realizó en 18 cm 3-11 NL rango de pH

tiras de IPG, previamente rehidratado con tampón de rehidratación (8 M urea, 4% (w/v) CHAPS, 13 mM DTT, 1% pharmalytes pH 3-11 NL). El enfoque isoeléctrico de primera dimensión se realizó a 20°C utilizando el siguiente programa: 120V por 1 h (120 Vhr), 300V por 3 h (900 Vhr), 300-1000V por 6 h (3900 Vhr), 1000-8000V por 3 h (13500 Vhr), 8000V por 7 h 30 min (60000 Vhr) y 500V por 12 h. Después de esto, las tiras se equilibraron primero durante 15 min en solución reductora (6 M urea, 50 mM Tris-HCl pH 6.8, 30% v/v glycerol, 2% w/v SDS y 2% w/v DTT) y en segundo lugar durante 15 min en solución alquilante [6 M urea, 50 mM Tris-HCl pH 6.8, 30% v/v glycerol, 2% w/v SDS y 2.5% iodoacetamide (Sigma)]. Segunda dimensión SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis*) se ejecutó en 11,5% (w/v) geles de acrilamida en placas de vidrio de baja fluorescencia. La electroforesis se realizó en 20°C, 1 W/gel por 20 hs, utilizando la unidad Ettan™ DALTsix.

Se prepararon los geles preparativos a partir de las muestras de la mezcla de la biopelícula y de mezcla planctónico. Para la separación de primera dimensión en pH 3-11 NL IPG tiras, 500 µg de muestra de proteína se centró con el siguiente programa: 120V por 1 h (120 Vhr), 300V por 3 h (900 Vhr), 300-1000V por 6 h (3900 Vhr), 1000-8000V por 3 h (13500 Vhr), 8000V por 8 h 45 min (70000 Vhr) y 500V por 12 h.

#### 4. Adquisición de imágenes e análisis de electroforesis en gel diferencial

Las proteínas se visualizaron usando el escáner Typhoon 9400™ (GE Healthcare) con filtros CyDye. Para la adquisición de imágenes Cy3, Cy5 y Cy2, se utilizaron 532 nm/580 nm, 633 nm/670 nm, y 488 nm/520 nm longitudes de onda de excitación / emisión, respectivamente, y 100 µm como tamaño de píxel. El recorte y filtrado de imágenes se llevó a cabo con el software Image Quant v.5.1 (GE Healthcare). Los análisis de la detección de diferentes abundancias entre manchas de diferentes réplicas se realizaron con el módulo DIA (*Differential In gel Analysis*) del paquete DeCyder 6.5 (GE Healthcare). El módulo BVA (*Biological Variance Analysis*) se usó para corregir la variabilidad entre geles mediante emparejamiento y normalización de los mapas de puntos con estándar interno. El gel de imagen del estándar interno con el mayor número de manchas se utilizó como el gel máster.

Para comparar la producción proteómica planctónica frente a la biopelícula, se calcularon las proporciones medias y la prueba T de *Student* para los datos no pareados. Aquellas manchas de proteína con un umbral de 1,5 en la proporción media y con valores de p por debajo de 0,05 se consideró que tenían una expresión diferencial estadísticamente significativa.

## 5. Identificación de las proteínas

El perfil de proteína total se detectó tiñendo los geles DIGE con tinción coloidal de *Coomassie*. Las manchas del gel de interés se escindieron manualmente de los geles. Las proteínas seleccionadas para el análisis se redujeron en el gel, se alquilaron y se digirieron con tripsina (Sechi y Chait, 2000). Las muestras se redujeron con 10 mM DTE en 25 mM bicarbonato de amonio durante 30 min a 56°C y posteriormente se alquilaron con yodoacetamida 55 mM en bicarbonato de amonio 25 mM durante 15 min en la oscuridad. Finalmente, las muestras fueron digeridas con 12,5 ng/μL tripsina de grado de secuenciación (Roche) en 25 mM bicarbonato de amonio (pH 8,5) durante la noche a 37°C. Después de la digestión, se recogió el sobrenadante y 1 μL se colocó sobre una placa diana MALDI y se dejó secar al aire a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió 0,4 μL de 3 mg / mL de matriz de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (Sigma) en acetonitrilo al 50% a las manchas secas de digestión de péptidos y se dejó secar de nuevo al aire a temperatura ambiente.

Los análisis de masas se realizaron en espectrómetro de masas 4800 Plus Proteomics Analyzer MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems, MDS Sciex, Toronto, Canadá) en el Centro de Genómica y Proteómica, Universidad Complutense, Madrid (España). MALDI-TOF/TOF fue operado en modo reflector positivo con un voltaje de aceleración de 20000 V. Todos los espectros de masas se calibraron internamente utilizando péptidos de la autodigestión de tripsina.

Las proteínas identificadas ambiguamente por huellas dactilares de masa de péptidos se sometieron a análisis de secuenciación por espectrometría de masas en tándem (MS / MS), utilizando el 4800 plus Proteomics Analyzer. El modelo de placa y la calibración predeterminada se optimizaron para el procesamiento de espectros MS-MS.

Para la identificación de proteínas NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, EE.UU.) (40910947 secuencias; 14639572021 residuos)

e Actinomicetos (77445 secuencias; 20877593 residuos) con restricción taxonómica a *A. actinomycetemcomitans* fueron buscados usando MASCOT 2.3 (www.matrixscience.com) a través del Global Protein Server v 3.6 de ABSciex. Los parámetros de búsqueda fueron:

- carbamidometil cisteína como modificación fija y metionina oxidada como modificación variable;
- tolerancia a la masa de péptidos, 50 ppm (PMF) -80 ppm;
- 1 sitio de escisión de tripsina perdido;
- tolerancia a fragmentos de MS-MS, 0,3 Da.

Los parámetros para la búsqueda combinada (Huella dactilar de masa de péptidos más espectros MS-MS) fueron los mismos descritos anteriormente. En toda identificación de proteínas, las puntuaciones de probabilidad eran mayores que la puntuación fijada por el MASCOT como significativa con una  $p < 0,05$ .

#### 6. Preparación de la membrana externa, SDS-PAGE e inmunotransferencia (Western blot)

Las proteínas de membrana externa se prepararon a partir de las muestras de la biopelícula y del estado planctónico de *A. actinomycetemcomitans* mediante una versión ligeramente modificada del método de Haase (Haase y cols., 1999). Las células de la biopelícula y del estado planctónico se resuspendieron en 10 mM HEPES (Sigma) (pH 7,4) que contiene 0,5 mM de PMSF (Sigma) y 1x cóctel inhibidor de proteasas (Roche). La suspensión se sonicó con un sonicador de punta Labsonic (B. Braun) con 20 ciclos de 10s cada uno (100% de amplitud ultrasónica). Para evitar el sobrecalentamiento del material, las muestras se mantuvieron en hielo durante el proceso de sonicación. Luego, los restos celulares se retiraron mediante centrifugación durante 10 min a 2000 x g a 4°C. El sedimento total de la membrana obtenido por ultracentrifugación del sobrenadante en 105.000 x g por 1 h (Beckman Ti50.3 rotor; Beckman Coulter, Brea, CA, EE.UU.) a 4°C luego se suspendió en lauroilsarcosina sódica al 1% (Sarkosyl, Sigma) en 10 mM HEPES (pH 7.4) y se agitó suavemente durante 1h a temperatura ambiente. La fracción enriquecida de la membrana externa se peletizó mediante ultracentrifugación a 105.000 x g por 1 h a 4°C, luego se resuspendió en 300 µL de agua destilada y la proteína se cuantificó utilizando el ensayo de proteínas de Bradford.



Las proteínas de las muestras de la membrana externa de la biopelícula y del estado planctónico (20 µg) se desnaturalizaron mediante calentamiento en tampón dodecil sulfato sódico (SDS) que consta de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, SDS al 5% (p / v), glicerol al 25% (v / v), azul de bromofenol al 0,2% (p / v) y DTT al 20% (p / v) durante 5 min a 95°C. Las muestras de proteína se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 10% utilizando el sistema de electroforesis Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Un estándar de masa molecular pre-manchado (Precision Plus Protein <sup>TM</sup>, Bio-Rad) se incluyó en cada ejecución. Las bandas de SDS-PAGE se escindieron del gel coloidal teñido con azul de *Coomassie* y se digirieron en gel. La identificación MALDI-TOF se realizó como se describió anteriormente.

Para el análisis de inmunotransferencia, las proteínas se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0,45 µm (Amersham <sup>TM</sup> Protran <sup>TM</sup>; GE Healthcare) a 100 mA durante 1 hora usando 1x Transfer Buffer (38,6 mM de glicina, 41,3 mM de Tris, 0,04% de SDS, 20% de metanol). La transferencia exitosa se controló usando los marcadores de transferencia Western ECL DualVue <sup>TM</sup> (GE Healthcare). La reactividad inespecífica se bloqueó 1h a temperatura ambiente. Las membranas se sondaron 2h a temperatura ambiente con un suero (dilución final 1: 400) extraído de un paciente (Código comité ético: 19/209-E) con periodontitis, positivo para *A. actinomycetemcomitans* en fluido crevicular gingival (9,6x10<sup>4</sup> UFC/ml). Como un control, se utilizó un suero extraído de un individuo periodontalmente sano, negativo para *A. actinomycetemcomitans* (1: 400). Después del lavado con TTBS (*Tween-Tris-buffered saline*), como anticuerpo secundario, se utilizó conjugado de peroxidasa anti-IgG humana (específico de Fc) (Sigma) (1: 2000 en TTBS) durante 2h a temperatura ambiente. Las bandas inmunorreactivas se visualizaron usando un sistema de detección de quimioluminiscencia ECL (*Enhanced chemiluminescence*, Western blotting detection reagents, GE Healthcare) en una película de rayos (GE Healthcare).

## II. Estudio 2: Estudio de la expresión diferencial de proteínas de

### *F. nucleatum*

#### 1. Cepa bacteriana, condiciones de cultivo, extracción de proteínas

La cepa bacteriana de *F. nucleatum* DSM 20482 fue seleccionada y cultivada en placas de agar sangre siguiendo el mismo protocolo que se mencionó anteriormente en el estudio 1. Lo mismo se aplica al método de obtención de cultivos de células planctónicas de *F. nucleatum* y de la biopelícula monoespecie.

En el estudio 2 los sedimentos de las células de la biopelícula y del estado planctónico, se rompieron usando un sonicador de punta (Branson Sonifier™, Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, CT, EE.UU.) con pulsos discontinuos de 20 milisegundos durante 3 segundos.

Se procesaron tres muestras combinadas de los estados de la biopelícula y planctónico para los experimentos proteómicos. Cada grupo correspondió a una réplica biológica y se procesó de la misma manera, siguiendo el mismo protocolo del estudio 1.

#### 2. Diseño experimental, adquisición de imágenes e análisis DIGE

El marcaje de las muestras con tintes Cy3, Cy5 y Cy2 se realizó utilizando reactivos, equipos y metodología del estudio 1. Las muestras se separaron en la primera y segunda dimensión y se realizó la electroforesis, siguiendo en todos los pasos el mismo protocolo del estudio 1. Los análisis de la detección de diferentes abundancias entre manchas de diferentes réplicas se han realizado con los módulos DIA y BVA, mencionados anteriormente en estudio 1. El análisis estadístico siguió el protocolo del estudio anterior, de *A. actinomycetemcomitans*.

#### 3. Identificación de proteínas

Identificación de proteínas se llevó a cabo siguiendo el protocolo de estudio mencionado anteriormente.

Para la identificación de proteínas NCBI nr (17919084 secuencias; 6150218869 residuos) con restricción taxonómica a bacterias (Eubacterias) (10721018 secuencias) fueron buscados usando MASCOT 2.3 con los parámetros de búsqueda que correspondiente al estudio 1.

#### 4. Ensayos enzimáticos

Todas las mediciones de enzimas se realizaron en cubetas de cuarzo a temperatura ambiente utilizando un volumen final de 1 mL. Se realizaron los siguientes ensayos:

- Tiolasa (acetil-CoA acetiltransferasa)

En las muestras de biopelícula y de estado planctónico, los sedimentos se resuspendieron en 100 mM tampón que contiene Tris-HCl pH 8,0, 0,5 mM PMSF (Sigma) y 1x Cóctel inhibidor de proteasas (Roche). Las células se rompieron usando un sonicador de punta como se ha descrito anteriormente. Para obtener una cantidad suficiente de proteína, los sobrenadantes se concentraron usando un Amicon® Ultra-15 10K (filtro de corte 10kDa; Merck Millipore Ltd., Cork, Irlanda) y la concentración de proteína se determinó mediante el ensayo de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.). Este extracto de proteína se utilizó para la actividad de tiolasa. Esto se determinó en la dirección tiolítica con acetoacetil-CoA como sustrato mediante el control de la disminución de la absorbancia a 303 nm (Stern, 1956). La actividad se ensayó mediante una versión ligeramente modificada del método de Hartmanis et al (Hartmanis and Gatenbeck, 1984). Esta actividad se midió cada minuto durante 1 hora en cada experimento. La mezcla de ensayo contenía: 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM DTT, 10 mM MgCl<sub>2</sub> (Cloruro de magnesio) y 500 µg extracto de proteína de la biopelícula o planctónico. La adición de acetoacetil-CoA (acetoacetil coenzima A) 100 µM (MP Biomedicals, Solon, OH, EE.UU.) y coenzima A 400 µM (MP Biomedicals) inició la reacción. La desaparición de la acetoacetil-CoA se controló a 303 nm en cubetas de cuarzo. Estos experimentos se repitieron tres veces en días diferentes. Se utilizó la prueba T de *Student* para datos no apareados para analizar si las diferencias de las pendientes correspondientes a la absorbancia disminuida en ambas condiciones (la biopelícula y planctónico) fueron estadísticamente significativas.

- 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa

Los sedimentos bacterianos de la biopelícula y estado planctónico, se resuspendieron en 100 mM tampón de fosfato de potasio pH 6,5 con 0,5 mM PMSF (Sigma) y 1x cóctel inhibidor de proteasas (Roche). Las células de la biopelícula y planctónico se rompieron usando un sonicador de punta como se ha descrito anteriormente. Para obtener una cantidad suficiente de proteína, los sobrenadantes se concentraron usando un Amicon® Ultra-15 10K y la concentración de proteína se determinó mediante el ensayo de Bradford (Bio-Rad). Este extracto de proteína se utilizó para la actividad 3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa. Esto se determinó midiendo la disminución de absorción del dinucleótido de  $\beta$ -nicotinamida y adenina reducida (NADH) en 340 nm (Aboulnaga y cols., 2013). Esta actividad se midió cada minuto durante 1 hora en cada experimento. La mezcla de reacción contenía: 100 mM fosfato de potasio pH 6.5, 1 mM DTT, 350  $\mu$ g extracto de proteína de biofilm o planctónico y 200  $\mu$ M NADH (Sigma). La adición de 100  $\mu$ M acetoacetyl-CoA (MP Biomedicals) inició la reacción. Estos experimentos se repitieron tres veces en días diferentes. El análisis estadístico siguió el protocolo de tiolasa.

### **III. Estudio 3: Estudio de la expresión diferencial de proteínas de**

#### ***P. gingivalis***

##### **1. Cepa bacteriana, condiciones de cultivo, extracción de proteínas**

Se desarrollaron dos tipos de condiciones de crecimiento, la biopelícula y el estado planctónico, de la cepa bacteriana *P. gingivalis* ATCC 33277 siguiendo la metodología de los dos estudios previos.

En caso de la biopelícula de *P. gingivalis*, se formó sobre los discos cerámicos estériles de HAP cálcica (Clarkson Chromatography Products, Williamsport, PA, EE. UU.), sumergidos en placas de poliestireno preesterilizado de 24 pocillos (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Alemania). Cada pocillo contenía 1,5 mL de medio BHI modificado con la misma suspensión de bacterias que contenía  $10^7$  UFC/mL. El cultivo del estado planctónico se obtuvo según la metodología de los estudios 1 y 2. Ambos cultivos celulares se incubaron en condiciones anaeróbicas a 37 ° C durante 96 h.

Las células bacterianas de la biopelícula de los discos de HA se recogieron en 1 mL de PBS, se centrifugaron a 13000 rpm 5 min 4°C y los sedimentos se agruparon y conservaron congelados a -20°C hasta la preparación de la muestra. Las muestras de las proteínas bacterianas del estado planctónico se procesaron según la metodología de los estudios 1 y 2.

Para controlar la ausencia de contaminación, 100 µL de muestra de cada condición se diluyeron en serie y se cultivaron en placas de agar sangre suplementadas en condiciones anaeróbicas a 37 ° C durante 14 días.

Ambos sedimentos pasaron las mismas etapas de preparación de muestras, como se mencionó anteriormente, en los estudios 1 y 2. Sin embargo, en el estudio 3, para eliminar los desechos residuales, las muestras se centrifugaron y el sobrenadante se precipitó con metanol y cloroformo (mediante la adición de 3xMeOH [*Methanol*]: 1xCHCl<sub>3</sub> [*Chloromethylene*]: 3xH<sub>2</sub>O-LC [*Biosolve water*]). Las proteínas precipitadas se recuperaron por centrifugación (14000 rpm, 5 min, 4 ° C), se eliminó el sobrenadante y se añadió 3xMeOH, después de agitar y centrifugar (14000 rpm, 10 min, 4 ° C). Se separó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en un tampón de solubilización (Tris 25 mM [GE Healthcare], urea 7 M [GE Healthcare], tiourea 2 M

[GE Healthcare] y CHAPS al 4% [p / v] [GE Healthcare]) agitando con vórtex durante 3h a temperatura ambiente y mediante sonicación en un baño de ultrasónido (Branson), cuatro veces durante 5 min. La concentración de proteína se cuantificó utilizando 2D-Quant Kit (GE Healthcare).

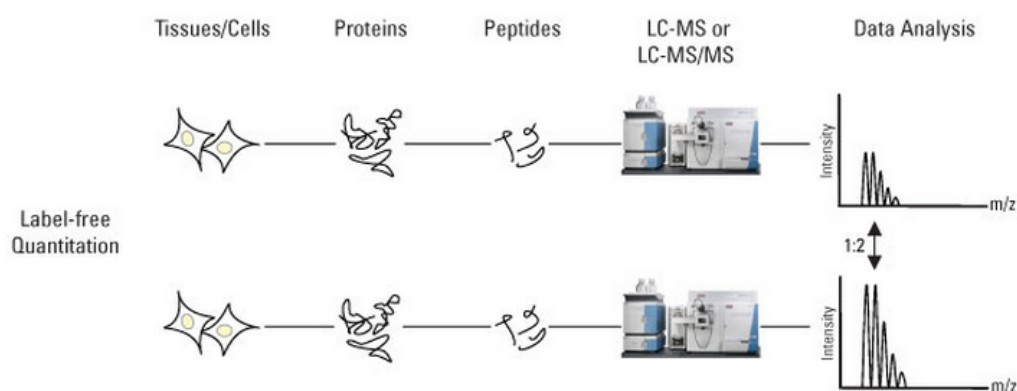
## 2. Digestión y desalación de péptidos

Las bandas de proteínas se cortaron del gel para llevar a cabo la digestión con tripsina en gel. La banda de proteínas se redujo en gel con DTT, se alquiló con yodacetamida y se digirió con una proporción 1/25 (p / p) de tripsina recombinante (*Trypsin sequencing grade*; Roche) durante la noche a 37°C (Sechi y Chait, 2000). Los péptidos de las proteínas digeridas se desalaron y concentraron con cromatografía de fase inversa C18 (OMIX C18, Agilent Technologies) y los péptidos se eluyeron con acetonitrilo al 80%/ ácido trifluoroacético al 0,1%. Antes del análisis Nano LC-MS / MS (*Nanoscale liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*), las muestras se liofilizaron en *Speed-vac* y se resuspendieron en 0,1% ácido fórmico. Los sobrenadantes se almacenaron a -20 °C.

## 3. Cromatografía líquida-espectrometría de masas

La digestión de proteína purificada se analizó mediante RP-LC-ESI-MS / MS (*Reversed Phase Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry*) en un sistema EASY-nLC 1000 acoplado al espectrómetro de masas Q-Exactive HF a través de la fuente de pulverización *Nano-Easy* (todo de Thermo Scientific, mississagua, ON, Canadá). El péptido se cargó primero en una columna de captura Acclaim PepMap 100 (Thermo Scientific, 20 mm x 75 µm de DI, resina C18 de 3 µm con un tamaño de poro de 100 Å) utilizando tampón A (acetonitrilo al 2%, ácido fórmico al 0.1%) y luego se separaron y se eluyeron en una columna analítica de resina C18 NTCC (Nikkyo Technos Co., Ltd. de 150 mm x 75 µm DI, resina C18 de 3 µm con un tamaño de poro de 100 Å), con una punta de pulverización integrada. Se utilizó un gradiente de tampón B del 5% al 35% (100% acetonitrilo, ácido fórmico al 0,1%) de 200 minutos, del 35% al 50% en 10 minutos y finalmente 10 minutos más hasta el 95% en el tampón A a un caudal constante de 250 nl / min. La adquisición de datos se realizó con un Q-Exactive HF. Los datos se adquirieron utilizando un voltaje

de pulverización de iones de 1,8 Kv y una temperatura de transferencia de iones de 250 °C. Todos los datos se obtuvieron mediante adquisición dependiente de datos (DDA) y en modo positivo con el software Xcalibur 4.0. Para un escaneo con filtro MS2, se seleccionaron los 15 precursores más abundantes con cargas de 2 a 4+ en los escaneos de MS1 para una fragmentación de disociación por colisión de mayor energía (por las siglas en inglés, *higher energy collisional dissociation* HCD) con una exclusión dinámica de 20s. Los escaneos de MS1 se adquirieron en un rango  $m/z$  de 350-2000 Da con una resolución de masa de 60.000 y un objetivo de control automático de ganancia (AGC) de 3E6 a un tiempo de iones máximo (ITmax) de 60 ms. El umbral para los escaneos MS2 fue 2E3; la energía de colisión normalizada (NCE) fue 27%; los fragmentos resueltos se escanearon con una resolución de masa de 30.000 y un valor objetivo de AGC de 1E5 en un ITmax de 100 ms (Figura 6).



**Figura 6.** Diagrama esquemático de Cromatografía líquida-espectrometría de masas. Adoptado de: [www.creative-proteomics.com](http://www.creative-proteomics.com)

#### 4. Identificación de proteínas

La identificación de péptidos a partir de datos brutos se llevó a cabo utilizando el motor de búsqueda Mascot v. 2.6.1 a través del software *Protein Discoverer* 2.2 (*Thermo Scientific*). La búsqueda en la base de datos se realizó contra *SwissProt* con restricción taxonómica a *P. gingivalis* (30600 secuencias y una base de datos de contaminantes (247 secuencias). Se utilizaron los siguientes parámetros para las búsquedas: escisión triptica después de Arg (arginina) y Lys (lisina), se permiten hasta dos sitios de escisión perdidos, y tolerancias de 10 ppm para iones precursores y 0,1 Da para iones fragmentados MS / MS y las búsquedas se realizaron permitiendo la oxidación opcional de metionina y la pérdida de metionina más acetilproteína N-terminal y carbamidometilación fija de cisteína. La búsqueda contra la base de datos

de señuelos (enfoque de señuelo integrado) se utilizó para calcular FDR (*False discovery rate*). Las puntuaciones Mascot se ajustaron mediante un algoritmo de filtrado. Los criterios de aceptación para la identificación de proteínas fueron un FDR <1% y al menos dos péptidos identificados con alta confianza (IC > 95%).

## 5. Cuantificación de proteína

Para determinar la abundancia de los péptidos y proteínas identificadas, se inicia un flujo de procesamiento en el primer paso. La recalibración de las masas se realiza mediante una búsqueda rápida en Sequest HT y una alineación de los cromatogramas con una tolerancia de 10min. Posteriormente se realiza el alineamiento de los tiempos de retención entre las diferentes muestras analizadas para la cuantificación de los iones precursores, teniendo en cuenta los péptidos únicos y los péptidos que pueden asignarse a más de una proteína. Finalmente, los resultados se normalizan a la cantidad total de péptidos, igualando la abundancia total entre las diferentes muestras. En este experimento se utilizó un diseño no anidado, donde la aplicación calcula las proporciones de los grupos de péptidos como la mediana geométrica de todas las combinaciones de proporciones, de todas las réplicas, para los factores seleccionados de estudio. La proporción de proteínas se calcula posteriormente como la mediana geométrica de las proporciones de los grupos de péptidos. Para demostrar la diferencia entre las categorías (Bio / Pla) en 3 réplicas biológicas de cada una, se aplicó la prueba ANOVA. El resultado de esta prueba es la estimación de un valor p utilizando la prueba HSD (por las siglas en inglés *honestly significant difference*) de Tukey (post hoc). En la cuantificación de proteínas se aplicaron una serie de filtros para determinar si una proteína se expresa de forma diferencial entre condiciones:

- Se aplicó un valor de  $p < 0,05$  como umbral para determinar si un grupo o proteína tiene abundancias significativamente diferentes.
- Doble cambio (*FC-Fold Change*): como proteínas diferenciales se consideran aquellas cuyo valor en  $\log_2(\text{ratio}) \geq \pm 0,6$ , eso significa que cuando es mayor o igual a 0,6, la abundancia de esa proteína es al menos 1,5 veces valor en comparación con la condición de control ( $FC \geq 1,5$  - proteínas sobreexpresadas) o menor o igual a -0,6 si la proteína está reprimida.



# *Resultados*

## **Resultados**

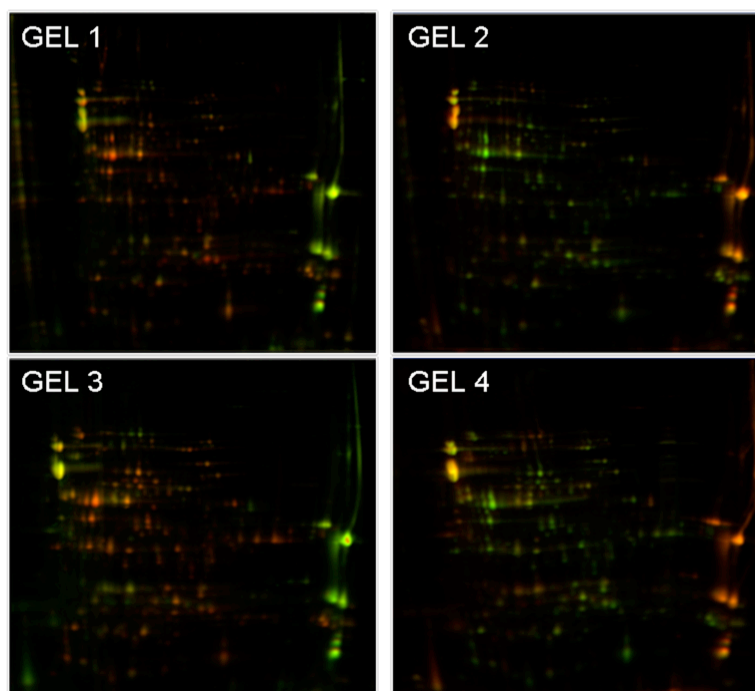
### **I. Estudio 1: Expresión diferencial de proteínas de**

#### ***A. actinomycetemcomitans***

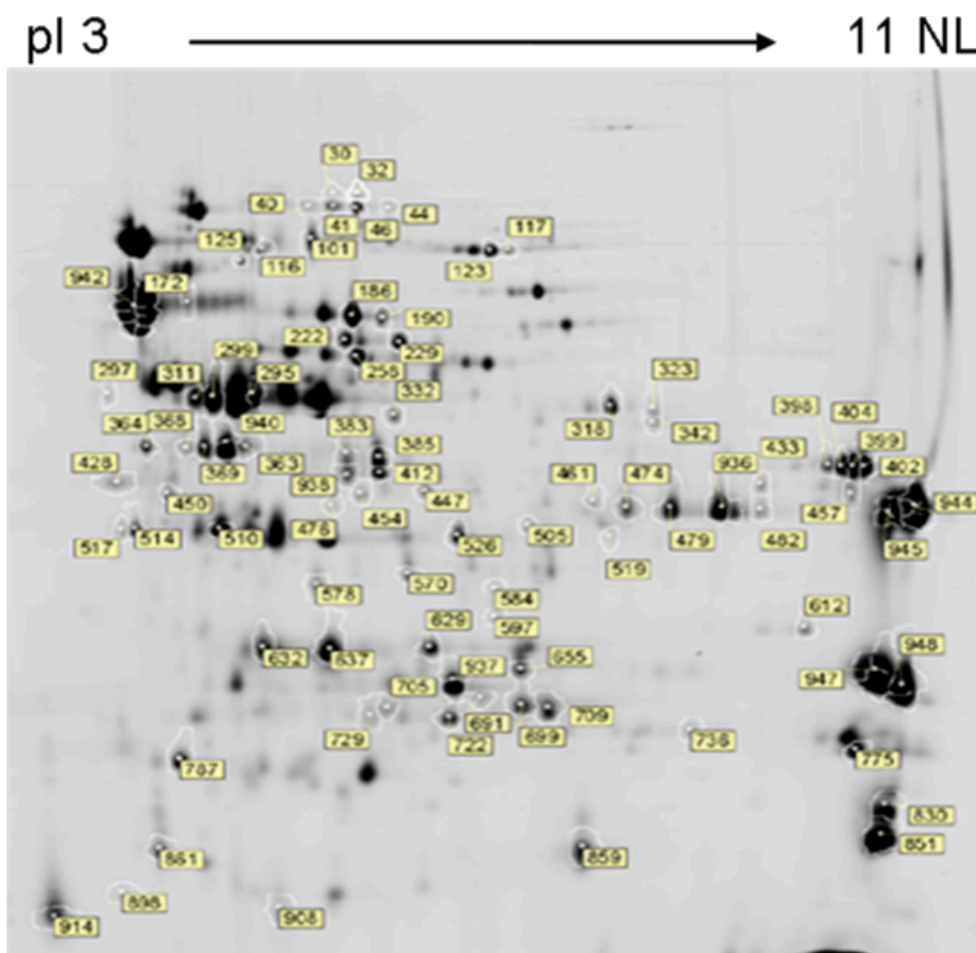
##### **1. Proteínas expresadas diferencialmente en la biopelícula frente al estado planctónico**

Las biopelículas desarrolladas en portaobjetos de HAP proporcionaron pequeñas cantidades de proteína que fueron insuficientes para el análisis proteómico. Por lo tanto, se utilizaron muestras combinadas, de manera similar a las muestras planctónicas.

Se identificaron ochenta y siete manchas proteicas, con las diferencias estadísticamente significativas (umbral-1,5 ( $p < 0,05$ )) en el nivel de expresión de proteínas (Figura 7) y se escindió un total de 79 manchas de proteína del gel.



**Figura 7.** El análisis 2D-DIGE <sup>TM</sup> : proteínas expresadas diferencialmente en la biopelícula y estado planctónico. Los cuatro geles correspondientes a las cuatro réplicas biológicas.



**Figura 8.** Escaneo 2D-DIGE de la muestra de *A. actinomycetemcomitans* con las proteínas expresadas diferencialmente, con el número Master correspondiente.

Con el análisis de los correspondientes fragmentos peptídicos (MALDI-TOF / TOF) se identificaron 71 proteínas (Tabla 1). Las proteínas no identificadas (8) no tenían suficiente cantidad de proteína disponible. Estas 71 manchas identificadas pertenecían a 50 proteínas únicas, varias con múltiples isoformas (es decir, la mancha 186 y la mancha 190) y, en algunos casos, las fracciones de proteínas eran partes de las mismas proteínas con los mismos puntos isoeléctricos, pero con tamaños más pequeños (mancha 612; mancha 948) (Figura 8). Los números del gel máster en la Figura 8 corresponden con los números en la Tabla 1, que resume las proteínas identificadas con sus datos estadísticos (prueba t). Estas proteínas se clasificaron de acuerdo con su función biológica en sobreexpresadas o reprimidas.

**Tabla 1.** Proteínas expresadas diferencialmente de *A. actinomycetemcomitans* en la biopelícula y estado planctónico.

Gel máster №.	Número de acceso	Nombre de la proteína	Biopelícula / Planctónico		% Cobertura de la secuencia	Puntuación
			t-Test	Umbral*		
Metabolismo						
101	491742098	Dihidrolipoamida acetiltransferasa	0.0023	1.89	24	341
117	491741753	Transcetolasa	0.0019	-1.6	33	108
123	491741753	Transcetolasa	0.0027	-1.52	42	182
186	491692275	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa	0.00012	-2.08	65	285
190	491692275	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa	0.00036	-1.6	22	101
222	518348158	Fosfomanomutasa	0.002	-1.94	44	246
229	518348158	Fosfomanomutasa	0.0015	-1.75	48	217
258	491724857	Aspartato amoniaco- liasa	0.0025	-1.66	36	472
295	491738229	Enolasa	0.00017	-1.93	59	175
299	491738229	Enolasa	0.000084	-2.07	57	150
311	491738229	Enolasa	0.00019	-1.77	20	64
363	491730152	Fosfoglicerato quinasa	0.00041	-1.82	35	82
368	491730152	Fosfoglicerato quinasa	0.00022	-1.51	39	74
369	491730152	Fosfoglicerato quinasa	0.00005	-1.8	47	101
940	491730152	Fosfoglicerato quinasa	0.000031	-2.56	62	224
383	491730150	Fructosa-bisfosfato aldolasa	0.000078	-1.63	8	126
385	491730150	Fructosa-bisfosfato aldolasa	0.000041	-2.4	60	201
412	491730150	Fructosa-bisfosfato aldolasa	0.000022	-2.76	55	147
938	491730150	Fructosa-bisfosfato aldolasa	0.000052	-2.16	26	77

450	491741811	PTS enzima IIAB	0.0033	2.11	39	159
474	491707379	Gliceraldehído-3- fosfato deshidrogenasa	0.00022	-1.78	18	112
479	491707379	Gliceraldehído-3- fosfato deshidrogenasa	0.00026	-1.69	25	302
482	491707379	Gliceraldehído-3- fosfato deshidrogenasa	0.000099	-2.49	15	141
936	491707379	Gliceraldehído-3- fosfato deshidrogenasa	0.000084	-2.39	75	174
722	491729956	Fosfogliceromutasa	0.00014	-1.54	75	201
787	491693918	Pirofosfatasa inorgánica	0.0011	-1.52	33	308
861	491709275	PTS enzima IIAB	0.000022	-2.32	59	151
937	491741684	Triosa fosfato isomerasa	0.001	-1.57	40	510
<b>Metabolismo de las purinas</b>						
116	491741998	3'-nucleotidasa	0.00017	-1.85	47	226
<b>Transcripción</b>						
364	491742573	Subunidad alfa de la ARNpolimerasa dir igida por ADN	0.0015	2	52	120
898	491714067	Factor de elongación de la transcripción GreA	0.00044	-1.75	44	64
125	491729383	Prolil-tRNA sintetasa	0.0019	-1.92	34	107
332	491690654	Tirosil-tRNA sintetasa	0.00019	-2.35	41	103
<b>Biosíntesis de aminoácidos</b>						
318	491689753	Serina hidroximetil transferasa	0.0002	-1.95	48	165
570	491699752	Dihidrodipicolinato sintasa	0.00029	-2.32	38	164
578	491691360	2,3,4,5- tetrahidropiridina-2-	0.0005	-1.53	49	136

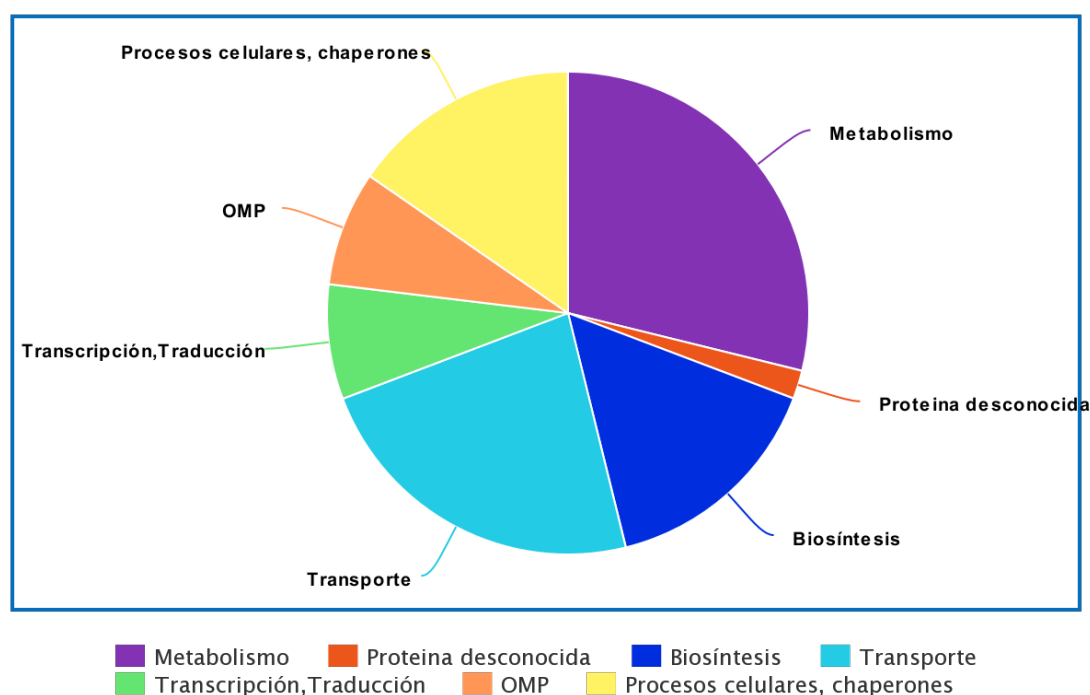
		carboxilato N-succiniltransferasa				
<b>Biosíntesis de cofactores</b>						
510	491693650	Tiorredoxina reductasa	0.00058	-1.85	59	152
<b>Biosíntesis de coenzimas</b>						
584	491690606	Piridoxamina quinasa	0.00017	-3	59	130
597	491690606	Piridoxamina quinasa	0.000031	-4.52	37	172
<b>Biosíntesis de ácidos grasos</b>						
629	491714182	Enoil -ACP reductasa	0.0012	-1.7	29	75
736	491742684	3-cetoacil-ACP reductasa	0.00045	-1.62	14	192
<b>Biosíntesis de ADP</b>						
691	491738131	Adenilato quinasa	0.0018	1.6	43	135
<b>Procesos celulares, chaperones</b>						
172	491780231	Chaperonina GroL	0.00017	2.08	50	189
942	491688234	Chaperona GroEl	0.00053	2.02	81	345
655	491720860	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa	0.000084	-1.96	49	101
<b>Procesos celulares, división celular</b>						
297	491735878	FtsZ proteína de la división celular	0.0034	1.53	52	135
<b>Cellular processes, detoxification</b>						
447	491688058	Metionina-sulfóxido reductasa	0.00036	-1.98	53	197
454	491692871	Asparaginasa	0.0014	-1.71	47	166
632	443551738	Proteína similar a la peroxiredoxina	0.00065	2.11	48	383
637	443551738	Proteína similar a la peroxiredoxina	0.0028	1.6	73	147
859	491692661	Superóxido dismutasa	0.002	-1.98	69	94
<b>OMP</b>						
41	503933512	Proteína de membrana externa YaeT	0.00018	3.02	23	121
46	503933512	Proteína de membrana externa YaeT	0.00029	2.76	42	215
398	491755504	Proteína de	0.00016	3.75	54	128

		membrana externa 39				
399	491755504	Proteína de membrana externa 39	0.00018	3.98	65	215
402	491755504	Proteína de membrana externa 39	0.00025	3.53	75	276
404	491755504	Proteína de membrana externa 39	0.000084	4.08	61	185
612	491755504	Proteína de membrana externa 39	0.0005	3.57	54	144
830	491761969	Proteína de membrana externa 18/16	0.0017	4.11	75	180
851	491761969	Proteína de membrana externa 18/16	0.000078	3.52	79	252
944	491728526	Proteína de membrana externa A	0.000087	3.93	76	311
945	491728526	Proteína de membrana externa A	0.00041	4.27	76	310
947	491728526	Proteína de membrana externa A	0.000096	4.06	39	108
948	491728526	Proteína de membrana externa A	0.000052	3.72	69	213
<b>Transporte</b>						
342	491712350	TolB proteína de translocación	0.000078	2.89	41	152
428	601112850	Espermidina / Putrescina ABC	0.000087	3.65	48	127
457	491732394	Proteína transportadora de ABC	0.0049	-1.86	37	112
514	491737575	Espermidina / Putrescina ABC	0.000031	-2.11	56	268
517	491756829	Espermidina / Putrescina ABC	0.00062	-1.76	25	62
519	491722381	Proteína transportadora de ABC	0.000052	-2.25	73	91
526	491774383	Pirofosfato de tiamina	0.00049	-2.14	44	117

699	491691137	Transportadora ABC	0.0019	-2.35	69	143
705	491691137	Transportadora ABC	0.0021	-2.18	69	154
709	491780558	Transportadora ABC	0.000084	-2.2	45	284
729	491727698	Transportadora ABC	0.000022	-1.91	53	121
775	429155223	Proteína de tolerancia al tolueno	0.00062	-1.92	52	103
908	491718896	Transportadora de hierro	0.00036	-2.32	44	98
<b>Desconocida</b>						
461	491744613	Proteína hipotética	0.0025	-1.79	23	88

- Umbral de expresión, “+” proteína sobreexpresada, “-” proteína reprimida

Para caracterizar las funciones de las proteínas expresadas diferencialmente de *A. actinomycetemcomitans*, las proteínas se clasificaron funcionalmente en siete categorías, como: metabolismo (29%), biosíntesis (15%), traducción y transcripción (8%), OMP (8%), transporte (23%), otros procesos celulares, chaperonas (15%) y proteínas no caracterizadas (2%). (Figura 9)



**Figura 9:** Las funciones de las proteínas expresadas diferencialmente de *A. actinomycetemcomitans*



## 2. Proteínas reprimidas en la biopelícula

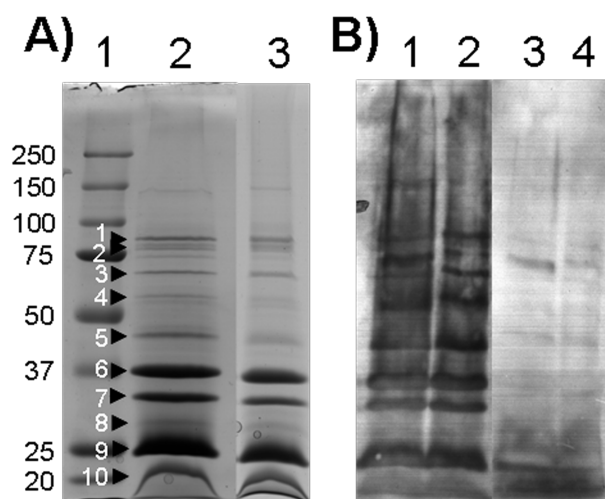
La mayoría de las diferencias estadísticamente significativas en *A. actinomycetemcomitans* se asociaron con la represión de la expresión de proteínas. Se identificaron 37 proteínas reprimidas de un total de 50 proteínas diferenciales (Tabla 1). El análisis de las categorías funcionales de proteínas confirmó que esta disminución en la expresión de proteínas representaba un estado de metabolismo más bajo, biosíntesis (biosíntesis de aminoácidos, coenzimas, cofactores o ácidos grasos) y transporte, lo que es consistente con la reducción de la actividad metabólica que se produce en las biopelículas maduras.

## 3. Proteínas sobreexpresadas en la biopelícula

Se identificaron 24 proteínas sobreexpresadas, que correspondían a 13 proteínas únicas (Tabla 1). Estos eran principalmente OMP, proteínas que tienen unas propiedades inmunogénicas y proteínas que confieren virulencia.

## 4. Validación de las proteínas

Con el objetivo de confirmar la inmunogenicidad de estas proteínas se extrajo un enriquecimiento de estas proteínas en ambos estados (biopelícula y planctónico); se obtuvieron diferentes OMP, proteínas de membrana y chaperona GroEl (Figura 10A, Tabla 2). Sus respuestas inmunogénicas se probaron mediante *immunoblotting*. Se observó que se produjo una fuerte respuesta inmune (en biopelículas y estados planctónicos) con el suero del paciente con periodontitis, positivo para *A. actinomycetemcomitans* (Figura 10B, carriles 1 y 2) en comparación con el sujeto periodontalmente sano y negativo para *A. actinomycetemcomitans* (Figura 10B, carriles 3 y 4). La respuesta inmune fue similar en la biopelícula y en las condiciones planctónicas: los perfiles de proteínas identificados fueron análogos (Tabla 2) y la cantidad de proteína en el gel es idéntica (Figura 10A, carriles 2 y 3); aunque la expresión medida de estas proteínas fue diferente cuando se evaluó por DIGE™ (sobreexpresado en la biopelícula).



**Figura 10:** Proteínas de la membrana externa (OMP) *A. actinomycetemcomitans* DSM8324. A) OMP se separaron por SDS-PAGE, usando gel de poliacrilamida al 10%, luego se tiñeron con *Coomassie coloidal*. Carril 1 - marcador molecular; Carril 2 - extracto de biopelícula; Carril 3 - extracto de planctónico. Las bandas extraídas del gel e identificadas por MS (MALDI-TOF / TOF) se indicaron mediante flechas y números. B) *Western blot* de los diferentes extractos de OMPs, utilizando suero de un paciente con periodontitis y un paciente sano. Carril 1, extracto de biopelícula incubada con suero humano de un paciente con periodontitis; Carril 2, extracto del estado planctónico incubado con el suero de un paciente con periodontitis; Carril 3, extracto de la biopelícula incubado con suero humano de un paciente sano; Carril 4, extracto del estado planctónico incubado con suero humano de un paciente sano.

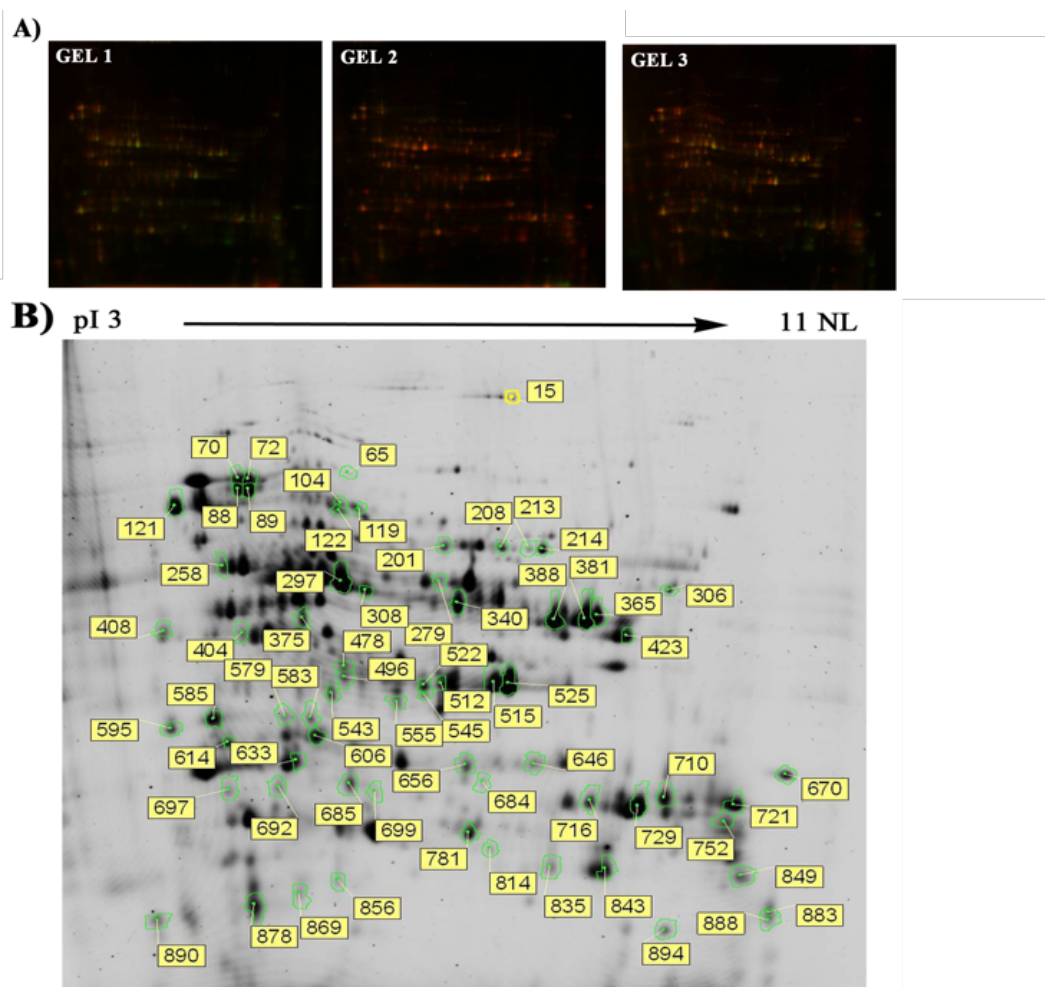
**Tabla 2:** Proteínas identificadas por espectrometría de masas a partir de fracciones de enriquecimiento de las proteínas de la membrana externa de la biopelícula y del estado planctónico.

<b>Nº Banda</b>	<b>Número de acceso</b>	<b>Nombre de la proteína</b>
1	503933512	Proteína de la membrana externa YaeT
2	502578142	Proteína de la membrana externa LptD
	491729990	PgaAPoli- $\beta$ -1,6-N-acetil-D-glucosamina
3	491689683	TonB
4	491780231	Chaperona GroEl
5	491725647	Similar a OMPA
	491701003	Proteína de la membrana TdeA
6	491755504	OMP39
7	491725647	Similar a OMPA
8	491725647	Similar a OMPA
9	491725647	Similar a OMPA
10	491761969	OMP18/16

## II. Estudio 2: Expresión diferencial de proteínas de *F. nuclatum*

### 1. Proteínas expresadas diferencialmente en la biopelícula frente al estado planctónico

Se utilizaron tres réplicas de las muestras agrupadas para cada condición, para obtener cantidades suficientes de proteína para el análisis proteómico. La abundancia diferencial de proteínas se comparó mediante el método DIGE, que implica el etiquetado aleatorio de la muestra con resoluble fluorescente CyDyes™ (Cy2, Cy3 y Cy5). Dos muestras de una réplica diferente (Cy3 y Cy5) y una alícuota del estándar interno (Cy2) se separaron mediante 2-DE en cada uno de los tres geles (Figura 11A).



**Figura 11.** El análisis 2D-DIGE™ : proteínas expresadas diferencialmente en la biopelícula y estado planctónico. A) Los tres geles correspondientes a las tres réplicas biológicas. B) Escaneo 2D-DIGE de la muestra de *F. nucleatum* con las proteínas expresadas diferencialmente, con el número del gel máster correspondiente.

Sesenta y ocho manchas de proteína mostraron diferencias estadísticamente significativas (1,5-umbral [ $p < 0,05$ ]) en su nivel de expresión de proteínas entre la biopelícula y el crecimiento planctónico. Se confirmó visualmente que estos puntos no eran artefactos (Figura 11 B) y se escindió un total de 62 manchas proteicas del gel. Sesenta y dos manchas identificadas representaron 49 proteínas únicas, ya que varias tenían múltiples isoformas (es decir, los puntos 70, 72, 88 y 89). En algunos casos se sobreexpresó una isoforma, mientras que en otros la isoforma se expresó de forma negativa (Figura 11 B). Los números en el gel máster en la Figura 11 B se corresponden con los números en la Tabla 3. La clasificación de proteínas se ha realizado según su función biológica. Había seis proteínas no identificadas debido a la falta de cantidad suficiente de proteína disponible. Las razones promedio y los valores  $p$  de la prueba  $t$  de Student se calculan utilizando el software Decyder™ v6.5.

**Tabla 3.** Las proteínas expresadas diferencialmente en *F. nucleatum* en la biopelícula y en estado planctónico.

Máster gel Nº.	Número de acceso	Nombre de la proteína	Biopelícula/ Planctónico		% Cobertura de secuencia	Puntuación de proteína
			t-Test	Umbral*		
Metabolismo						
70	254302597	Glutaconil-CoA descarboxilasa	0.0014	-2.67	57	257
72	254302597	Glutaconil-CoA descarboxilasa	0.00065	-2.64	49	224
88	254302597	Glutaconil-CoA descarboxilasa	0.000044	-2.8	42	192
89	254302597	Glutaconil-CoA descarboxilasa	0.0032	-2.07	62	302
201	254303334	Lisina 2,3-aminomutasa	0.0075	-1.64	42	113
258	254303536	Fosfopiruvato hidratasa	0.0031	-1.75	60	243
340	254302983	Acetato quinasa	0.044	1.53	66	200
375	254303335	Alcohol deshidrogenasa	0.024	1.67	40	157
478	254302700	Transcetolasa	0.003	-2.42	60	274

522	254302735	Fructosa-bisfosfato aldolasa	0.00014	5.85	64	532
545	254302735	Fructosa-bisfosfato aldolasa	0.0027	3.94	39	219
633	254304335	Triosa fosfato isomerasa	0.0015	1.83	75	477
856	254303269	Proteína-N(pi)-fosfohistidina azúcar fosfotransferasa	0.00077	4.9	50	90
<b>Vía del butirato</b>						
15	355370490	Piruvato: ferredoxina (flavodoxina) oxidoreductasa	0.015	2.41	31	195
297	254303809	Subunidad alfa de la flavoproteína de transferencia electrónica	0.023	1.69	51	244
308	254303809	Subunidad alfa de la flavoproteína de transferencia electrónica	0.0047	2.16	52	201
381	254304092	Acetil-CoA acetiltransferasa	0.000013	1.98	59	221
388	254304092	Acetil-CoA acetiltransferasa	0.0023	1.61	75	254
423	254303807	Butiril-CoA deshidrogenasa	0.031	2.06	68	225
555	254303151	3-hidroxi butiril-CoA deshidratasa	0.019	-1.64	37	425
579	254303150	3-hidroxi butiril-CoA deshidratasa	0.0039	-2.64	35	260
<b>Procesos celulares, chaperones</b>						
121	254302273	Peptidilprolil cis-trans isomerasa de tipo FKBP	0.00085	-1.63	61	267
869	254302755	Peptidilprolil cis-trans isomerasa (rotamasa)	0.0026	3.67	28	184
<b>Biosíntesis de purinas</b>						

208	254302919	Inosina-5'- monofosfato deshidrogenasa	0.0055	-1.56	43	354
213	254302919	Inosina-5'- monofosfato deshidrogenasa	0.0026	-2.27	32	121
214	254302919	Inosina-5'- monofosfato deshidrogenasa	0.015	-1.55	47	165
<b>Biosíntesis de proteínas</b>						
404	254303393	Factor de elongación EF18	0.029	-1.81	64	204
408	254303393	Factor de elongación EF18	0.019	-1.56	64	204
585	19704055	Factor de elongación P	0.000012	4.09	43	343
<b>Biosíntesis de cofactores</b>						
496	254303958	Biosíntesis de piridoxina	0.0032	-2.15	50	298
<b>Biosíntesis de aminoácidos</b>						
512	254303900	Síntesis de cisteína	0.0036	-2.17	64	491
515	254303900	Síntesis de cisteína	0.0069	-1.9	91	318
525	254303900	Síntesis de cisteína	0.0036	1.88	95	420
<b>Biosíntesis de ADP</b>						
685	254302850	Adenilato quinasa	0.0066	3.62	56	121
699	254302850	Adenilato quinasa	0.015	-3.56	38	116
<b>Transporte</b>						
595	254302678	Transportador ABC	0.0098	-1.89	61	226
646	254303574	Transportador ABC	0.00019	5.47	53	223
721	254303634	Transportador ABC	0.00043	4.29	46	107
752	254302964	Transportador ABC	0.0056	2.17	56	217
<b>Transcripción</b>						
656	254302132	LexA represor transcripcional	0.0024	3.09	21	122
692	254302296	NusG	0.000018	5.36	61	144
<b>Traducción</b>						
670	254303420	Proteína ribosomal	0.00041	3.24	70	138

		L3				
849	254302293	Proteína ribosomal L10	0.0023	1.84	82	197
883	254303405	Proteína ribosomal L6	0.0013	6.86	71	204
<b>OMP</b>						
365	254303326	Porina FomA	0.0062	-1.56	58	270
878	254302656	OmpA	0.041	-1.55	67	122
894	254303591	OmpW	0.0011	-2.68	54	153
<b>Catabolismo del propanediol</b>						
606	254302068	PduB	0.019	1.53	72	164
716	254302069	Subunidad media de propanodiol deshidratasa PduD	0.0025	6.82	54	404
<b>Estrés oxidativo</b>						
697	254302236	Peroxiredoxina	0.00031	-5.2	65	136
<b>Catabolismo del glutamato</b>						
279	254304080	Glutamato deshidrogenasa	0.015	-2.52	35	155
684	254302599	R-2-hidroxiglutaril- CoA deshidratasa	0.0019	2.97	41	184
<b>Proteína desconocida</b>						
306	254302084	Proteína hipotética FNP_2131	0.0078	1.86	18	83
543	254303862	Proteína hipotética FNP_1523	0.0015	2.17	32	86
614	254302665	Proteína hipotética FNP_0293	0.00018	-3.68	38	153
710	254302455	Proteína hipotética FNP_0078	0.015	2.15	18	107
729	254302369	Proteína hipotética FNP_2425	0.015	2.29	57	182
781	254302602	Proteína hipotética FNP_0229	0.0014	3.61	67	154
814	254304050	Proteína hipotética FNP_1719	0.0016	1.56	33	108
835	254303079	Proteína hipotética FNP_0718	0.0025	6.2	42	144



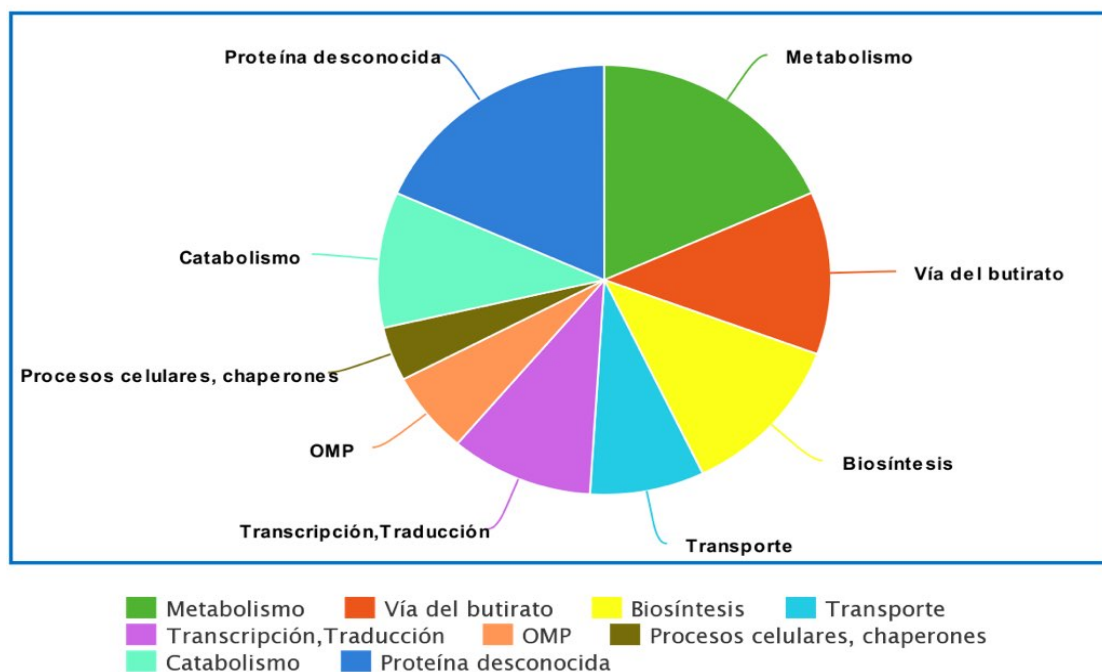
843	254303079	Proteína hipotética FNP_0718	0.0007	7.74	69	171
890	254303559	Proteína hipotética FNP_1215	0.012	-2.92	60	152

\* Umbral de expresión, “+” proteína sobreexpresada, “-” proteína reprimida

Se identificaron 20 proteínas reprimidas de un total de 49 proteínas diferenciales (Tabla 3). La mayoría de estas proteínas reprimidas estaban involucradas en procesos de metabolismo y biosíntesis.

Cuando *F. nucleatum* creció como biopelícula, 36 proteínas fue sobreexpresadas, que correspondía a 31 proteína única (Tabla 3). Se trataba principalmente de proteínas implicadas en el transporte, transcripción, traducción, catabolismo del propanodiol y proteínas con función desconocida.

Para caracterizar las funciones de las proteínas expresadas diferencialmente de *F. nucleatum*, las proteínas se clasificaron funcionalmente en nueve categorías, como: metabolismo (18%), biosíntesis (12%), traducción y transcripción (10%), catabolismo (10%), OMP (6%), transporte (8%), vía del butirato (12%), otros procesos celulares, chaperonas (4%) y proteínas no caracterizadas (18%). (Figura 12)

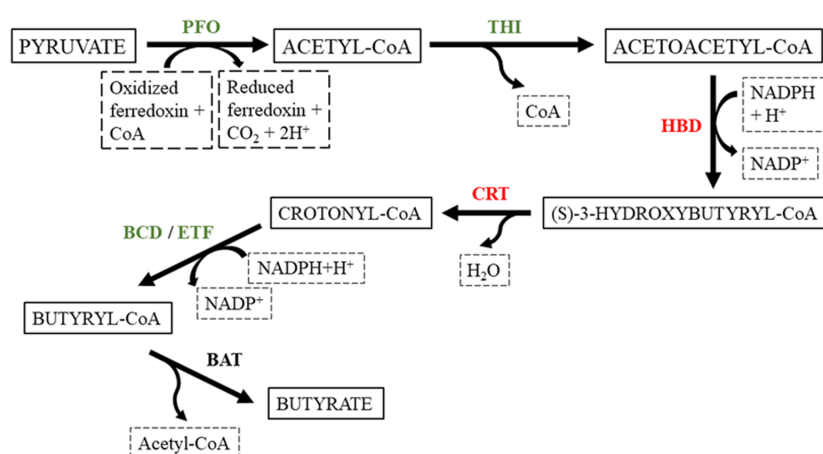


**Figura 12:** Las funciones de las proteínas expresadas diferencialmente de *P. gingivalis*

## 2. Proteínas de la vía del butirato con expresión diferencial

De las siete enzimas involucradas en esta vía, seis se expresaron diferencialmente creciendo como el biofilm frente a planctónico:

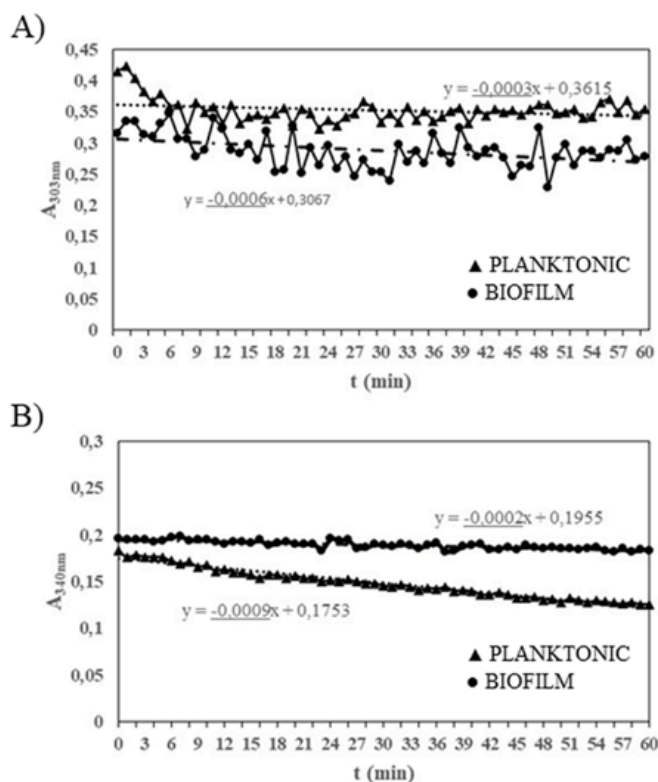
- ferredoxina (flavodoxina) oxidorreductasa (PFO), acetil-CoA acetiltransferasa, tiolasa (THI) y el complejo butiril-CoA deshidrogenasa (BCD) y subunidad alfa de flavoproteína de transferencia de electrones (ETF) estaban sobreexpresados;
- 3-hidroxi butiril-CoA deshidrogenasa (HBD) y la 3-hidroxi butiril-CoA deshidratasa (crotonasa, CRT) se reprimían (Figura 13).



**Figura 13.** La vía del butirato utilizando la base de datos de la vía metabólica KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Los nombres de las proteínas en verde indican que la proteína se sobreexpresa en la biopelícula frente al estado planctónico, y los nombres en rojo que se reprimen en la biopelícula frente al estado planctónico.

PFO: piruvato ferredoxina oxidorreductasa; THI: acetil-CoA acetiltransferasa (tiolasa); HBD: 3-hidroxi butiril-CoA deshidrogenasa; CRT: 3-hidroxi butiril-CoA deshidratasa (crotonasa); BCD: butiril-CoA deshidrogenasa; ETF: subunidad alfa de flavoproteína de transferencia de electrones; BAT: butirato-acetoacetato CoA-transferasa subunidad B.

Adaptado de KEGG.



**Figure 14.** Gráfico representativo de la actividad enzimática en ambas condiciones de crecimiento: A) Tiolasa (acetil-CoA acetiltransferasa) ▲ Planctónico ● Biopelícula B) 3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa ▲ Planctónico ● Biopelícula

En la Figura 14 se presenta un gráfico representativo de cada actividad enzimática en ambas condiciones de crecimiento, donde se calculó la pendiente a partir de la estimación de la tendencia lineal. Con los datos obtenidos de las pendientes de cada una de las gráficas de los dos ensayos enzimáticos, analizado en ambos estados de crecimiento (biopelícula o planctónico) la media y la desviación estándar se calcularon como se indica en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Valor de la pendiente correspondiente a la disminución de la absorbancia en los ensayos enzimáticos de tiolasa y  $\beta$ -hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa de *F. nucleatum* en el biofilm y en estado planctónico.

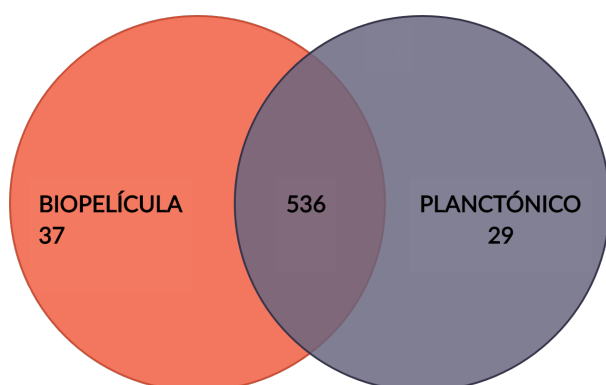
<b>TIOLASA</b>					
ESTADO DE CRECIMIENTO		PROTEINA TOTAL ( $\mu$ g)		$\Delta A_{303nm}$ (pendiente) Media (DE)*	
Biopelícula		500		$-5.67 \times 10^{-4}$ ( $5.77 \times 10^{-5}$ )	
Planctónico		500		$-3.33 \times 10^{-4}$ ( $5.77 \times 10^{-5}$ )	
<b><math>\beta</math>- HIDROXIBUTIRIL-CoA DEHIDROGENASA</b>					
ESTADO DE CRECIMIENTO		PROTEINA TOTAL ( $\mu$ g)		$\Delta A_{340nm}$ (pendiente) Media (DE)*	
Biopelícula		350		$-2.33 \times 10^{-4}$ ( $5.77 \times 10^{-5}$ )	
Planctónico		350		$-8.00 \times 10^{-4}$ ( $1.00 \times 10^{-4}$ )	

\* En todos los casos, las diferencias entre el biofilm y el estado planctónico fueron estadísticamente significativas según la prueba de *Student*. ( $p < 0,05$ ). DE - desviación estándar.

### III. Estudio 3: Expresión diferencial de proteínas de *P. gingivalis*

#### 1. Proteínas identificadas de *P. gingivalis*

La identificación de proteínas permitió la cuantificación de 7076 péptidos correspondientes a 602 proteínas (Figura 15).



**Figura 15.** Diagrama de Venn, número de proteínas identificadas en 3 réplicas biológicas de cada condición (comunes, biopelícula y planctónico)

De 565 proteínas identificadas en estado planctónico, 29 eran exclusivas para este estado y estaban relacionadas principalmente con el metabolismo, la adhesión célula-célula, el transporte, el sistema CRISPR y la función de transposones (Tabla 5A). Desde el otro lado en el modo de crecimiento de biopelícula se han identificado 573 proteínas con 37 proteínas exclusivas para este estado. Son proteínas involucradas en la virulencia, traducción, transcripción, estrés oxidativo (Tabla 5B).

**Tabla 5A:** Proteínas identificadas exclusivamente en el estado planctónico de *P. gingivalis*

Número de acceso	Cobertura %	Nombre de la proteína	PSMs Planc*	Péptidos Planctónico
<b>Virulencia</b>				
B2RH59	38	Subunidad mayor de fimbrium FimE	54	17
B2RH58	18	Subunidad mayor de fimbrium FimD	45	11
B2RHH1	23	OMP_b-brl	5	5
<b>Biosíntesis</b>				
A0A212GA00	27	Prolina-tRNA ligasa	33	11
A0A0K2J7H0	6	UDP-diacilglucosamina difosfatasa	8	2
A0A1R4AE12	8	Glicosil transferasa	5	3

A0A0K2J600	5	Tetraacilisacárido 4'-quinasa	5	2
Q7MW51	3	Proteína de unión a penicilina 1A	4	2
<b>Transporte</b>				
B2RLN4	21	Subunidad D de v-ATPasa	14	4
B2RLD3	35	Subunidad B del complejo oxidorreductasa	11	5
Q7MW66	15	Proteína no caracterizada	7	3
A0A0E2LRB1	4	DoxX	6	2
A0A0E2LTS7	5	Efflux Transportador, familia RND, subunidad MFP	4	2
<b>Metabolismo</b>				
A0A0E2LRN2	13	4-hidroxibutirato CoA transferasa	13	5
A0A0E2M7G9	5	Subunidad B butirato - acetoacetato de CoA-transferasa	9	2
A0A254MTR9	8	FtsH Metaloproteasa	6	4
W1R9F1	14	Fosfotransacetilasa	6	3
A0A0E2LNV4	4	Peptidasa, S9A/B/C	6	3
A0A212G9J5	5	Fe-S oxidoreductasa	3	2
<b>Traducción</b>				
Q7MTL3	13	50S proteína ribosomal L3	8	2
<b>Transposon</b>				
B2RGT2	19	Proteína conservada en el transposón conjugado	6	3
A0A1R4DW05	15	Proteína de transposón TraN	5	4
<b>CRISPR</b>				
A0A212G6Q0	4	CRISPR- proteína asociada Cas3	3	2
<b>Función desconocida</b>				
B2RM86	17	Proteína no caracterizada	19	7
B2RM56	10	GGDEF	6	4
A0A254N3Q8	31	DUF4494	6	3
A0A0E2LSD2	16	Proteína no caracterizada	5	2
B2RMH6	10	Proteína no caracterizada	3	2
B2RL09	5	Proteína no caracterizada	3	2

\* PSMs Planctónico (*peptide-to-spectrum matches*)

**Tabla 5B:** Proteínas identificadas exclusivamente en la biopelícula de *P. gingivalis*

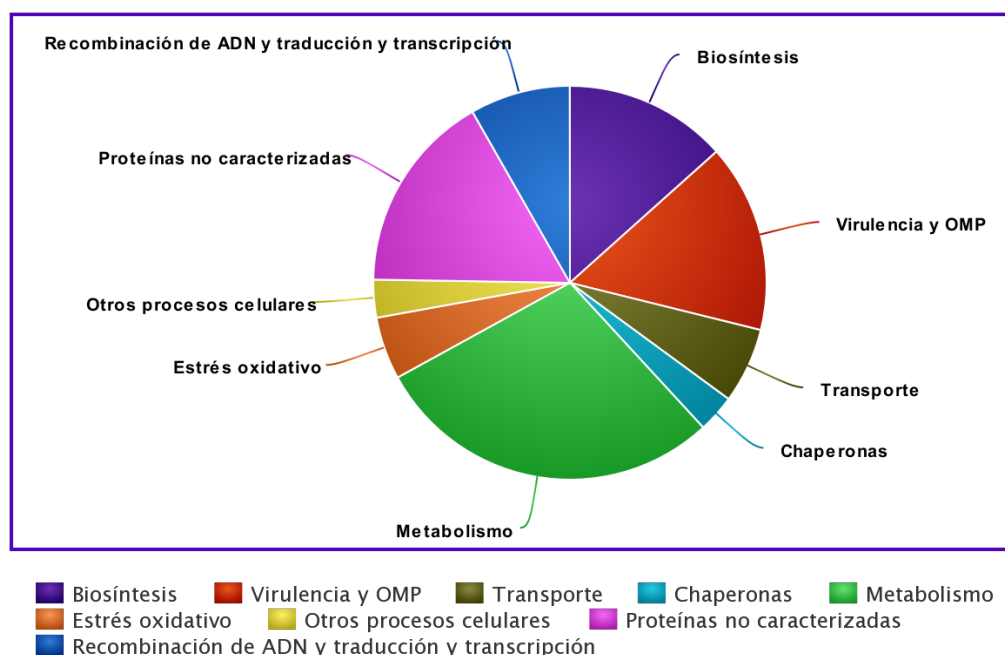
Número de acceso	Cobertura %	Nombre de la proteína	PSMs Biopel *	Péptidos Biopelícula
<b>Virulencia</b>				
Q7MTI5	19	Hemaglutinina HagB	23	7
B2RKQ6	6	Efflux proteína de la membrana externa	8	3
A0A0E2LN04	7	Pantotenato sintetasa	4	2
<b>Biosíntesis</b>				
B2RIE2	19	Aspartato-semialdehído deshidrogenasa	13	3
B2RJ04	15	Meso-diaminopimelato D-deshidrogenasa	9	3
A0A0E2LTI7	12	Glucosiltransferasa	6	4
A0A0E2LS98	4	Tiol proteasa / hemaglutinina PrtT	4	3
A0A0E2LQM7	5	L-aspartato oxidasa	3	2
A0A0E2M4G0	5	Fosfodiesterasa tipo I	2	2
<b>Metabolismo</b>				
B2RGM8	19	NAD- dependiente desacilasa	18	3
A0A0E2LS08	21	Guanina desaminasa	13	2
A0A0K2J3B7	13	Amidohidrolasa	5	3
A0A0E2LQS4	8	Amidinotransferasa	5	2
A0A1R4DXE6	12	Glucosamina-6-fosfato desaminasa	4	3
<b>Traducción, transcripción</b>				
A0A0E2LSG3	7	Ribonucleasa R	18	6
A0A0E2LPC6	20	Proteína de macrodominio	14	2
B2RJ07	21	Helicasa dependiente de ATP RuvA	9	2
A0A134DRV6	8	30S proteína ribosomal S2	7	2
A0A0E2M337	9	Tirosina recombinasa XerC	5	3
A0A212GB70	11	50S proteína ribosomal L4	4	3
B2RGQ9	21	50S proteína ribosomal L19	2	2
<b>Estrés oxidativo</b>				
B2RGZ4	41	proteína que contiene el dominio de tiorredoxina	10	4
A0A0E2LMZ8	4	HHE	5	2
A0A0E2LR90	11	NADH:ubiquinona reductasa ( transl ocación de H <sup>+</sup> )	3	2
B2RHM3	20	Proteína de fase estacionaria A	3	2

Chaperones				
A0A1R4AFI2	26	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa	30	4
A0A0E2LQ11	18	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa	7	4
A0A0E2LMI7	3	Proteína repetición tetratricopéptido	4	3
A0A254MY40	11	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa	3	2
Función desconocida				
A0A0E2M4I7	28	Proteína no caracterizada	23	5
A0A254N032	32	Proteína no caracterizada	21	3
A0A212GB22	13	Proteína no caracterizada	19	2
A0A0E2LNZ6	11	Proteína no caracterizada	16	4
A0A0K2J8F2	10	Proteína no caracterizada	11	3
B2RHI0	8	Proteína no caracterizada	7	2
A0A134DQ16	18	Proteína no caracterizada	7	2
A0A0E2M7N7	19	Proteína no caracterizada	4	2

\* PSMs Biopelícula (*peptide-to-spectrum matches*)

## 2. Proteínas expresadas diferencialmente

Se detectaron 60 proteínas expresadas diferencialmente entre dos condiciones, que se encuentran en la Tabla 6. En comparación con las bacterias planctónicas, 26 proteínas se sobreexpresaban significativamente ( $p < 0.05$ ) en la biopelícula de *P. gingivalis*.



**Figura 16:** Las funciones de las proteínas expresadas diferencialmente de *P. gingivalis*



Para caracterizar las funciones de las proteínas expresadas diferencialmente de *P. gingivalis*, las proteínas se clasificaron funcionalmente en nueve categorías, como: virulencia y OMP (15%), metabolismo (28%), biosíntesis (13%), recombinación de ADN y traducción y transcripción (8%), estrés oxidativo (5%), transporte (6%), chaperonas (3%), otros procesos celulares (3%) y proteínas no caracterizadas (16%). (Figura 16)

**Tabla 6:** Las proteínas expresadas diferencialmente de *P.gingivalis*

Número de acceso	Cobertura %	Nombre de la proteína	log2 ratio bio/p*	p-value
<b>Virulencia</b>				
Q7MTI5	15	Hemaglutinina HagB	2.98	0.044
B2RHG3	48	Subunidad menor de fimbrium Mfa3	-2.63	0.029
B2RLT2	24	Fimbrillin_C	-2.78	0.0214
B2RH57	22	Subunidad mayor de fimbrium FimC	-2.83	0.019
B2RH59	40	Subunidad mayor de fimbrium FimE	-3.1	0.011
B2RHG1	37	Subunidad menor de fimbrium Mfa1	-3.17	0.009
R4WWA2	66	Fimbrillin	-5.53	0.00001
R4WWE6	70	Fimbrillin	-5.93	0.00001
<b>OMP</b>				
B2RII3	58	35 kDa proteína de unión a hemina	-2.33	0.0499
<b>Metabolismo</b>				
A0A0E2LS08	21	Guanina desaminasa	6.64	1E-17
B2RGM8	19	NAD- dependiente desacilasa	5.14	0.0003
T2N7W1	8	Glucosa-6-fosfato isomerasa	3.13	0.0333
A0A0E2M6E0	19	Proteína de la familia de la fosforilasa	2.95	0.0463
A0A254MSW4	35	Histidina amoniaco liasa	-2.34	0.0489
A0A254MUX3	43	Fold	-2.37	0.0469
B2RIQ1	72	4- hidroxibutirilo -CoA deshidratasa	-2.39	0.0447
A0A1R4DVA5	13	GTP pirofosfoquinasa	-2.42	0.032
A0A212G885	23	Fumarato hidratasa clase I	-2.64	0.0284
A0A1R4ADP2	38	Formato - tetrahidrofolato ligasa	-2.9	0.0171
Q7MVJ2	57	Alcohol deshidrogenasa	-3.05	0.0125
A0A1R4DPH0	49	Acyl-CoA deshidrogenasa	-3.06	0.0122

B2RK02	48	Acetato quinasa	-3.4	0.0057
A0A0E2LRN2	13	Coenzima A 4-hidroxibutirato transferasa	-3.51	0.0045
B2RJU4	68	NADPH-NAD transhidrogenasa	-3.76	0.0024
A0A0E2M7G9	5	Butirato - acetoacetato CoA-transferasa	-4.4	0.0004
B2RLM6	28	Ferredoxina putativa 4Fe-4S	-4.84	0.0001
<b>Biosíntesis</b>				
Q7MU10	56	Proteína portadora de acilo	3.93	0.0064
A0A0E2LQM7	5	L-aspartato oxidasa	3.46	0.0256
B2RJ04	15	Meso-diaminopimelato D-deshidrogenasa	3.26	0.0372
A0A0E2LNT6	4	Tirosina - tRNA ligasa	-2.49	0.0304
B2RIN7	14	Sacaropina deshidrogenasa	-2.51	0.0304
Q7MVC9	5	Glucosil transferasa	-2.55	0.0269
A0A2D2N4L9	35	Metionina - tRNA ligasa	-2.59	0.0310
A0A212GA00	27	Prolina - tRNA ligasa	-2.59	0.0313
<b>Recombinación de ADN, traducción, transcripción</b>				
B2RJ07	21	Helicasa dependiente de ATP RuvA	6.64	1E-17
B2RGQ9	21	50S proteína ribosomal L19	3.59	0.0191
A0A212GB70	11	50S proteína ribosomal L4	3.47	0.0263
B2RL61	55	Factor de alargamiento Ts	3.35	0.0219
A0A0E2M337	9	Tirosina recombinasa XerC	3.22	0.0389
<b>Estrés oxidativo</b>				
B2RHM3	20	Proteína sobreexpresada en fase estacionaria A	4.41	0.002
A0A254MKK2	67	Tiol peroxidasa	2.94	0.0476
P19665	39	Superóxido dismutasa [Mn/Fe]	-4.25	0.0006
<b>Transporte</b>				
A0A0E2LR82	3	Transportador de pequeña conductancia MscS	3.08	0.0370
A0A0E2LTS7	5	Efflux transportador	-2.3	0.0414
B2RLN4	21	Subunidad D de v-ATPasa	-3.08	0.0079
B2RH85	11	ATPase2	-3.42	0.0039
<b>Chaperones</b>				
A0A1R4AFI2	26	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa	3.54	0.0149
A0A0E2LR02	5	Chaperona HtpG	-3.14	0.007
<b>Otros procesos celulares</b>				

A0A0E2M7L7	4	PglZ	5.06	0.0003
Q7MXB3	52	Proteína activadora de secreción	3.55	0.014
<b>Función desconocida</b>				
A0A0K2J8F2	10	Proteína no caracterizada	6.64	1E-17
B2RGS8	58	Proteína no caracterizada	6.24	8.4E-06
A0A0E2M4I7	26	Proteína no caracterizada	5.15	0.0002
A0A254N032	32	Proteína no caracterizada	5.12	0.0003
A0A1R4AF04	42	Proteína no caracterizada	3.34	0.0223
A0A0K2J3K5	12	Proteína no caracterizada	3.3	0.0240
A0A134DQ16	18	Proteína no caracterizada	3.1	0.0375
B2RMH6	10	Proteína no caracterizada	-2.29	0.0450
Q7MX91	55	Proteína no caracterizada	-2.98	0.0143
A0A0K2J7Y7	8	Proteína no caracterizada	-3.88	0.0014

\* log2 ratio biopelícula/planctónico

Las proteínas sobreexpresadas estaban implicadas en la virulencia, el metabolismo, la biosíntesis, la recombinación de ADN, la traducción, la transcripción, el estrés oxidativo, el transporte, los chaperones y otros procesos celulares. Por otro lado, encontramos que 34 proteínas, implicadas en la virulencia, OMP, el metabolismo, la biosíntesis, estrés oxidativo, transporte se reprimían.

Las proteínas implicadas en virulencia HagB, SlyD se han sobreexpresado, mientras que FimA, FimC, fimE, Mfa1, Mfa3 estaban reprimidos en la biopelícula de *P. gingivalis*.

Un grupo de proteínas relacionadas con la recombinación del ADN, la traducción y la transcripción se expresó diferencialmente, como se demuestra en la Tabla 6. Estas proteínas, representadas por RuvA, proteínas ribosomales RplS RplD, TSF fueron sobreexpresados en la biopelícula. Además, RuvA fue la proteína expresada de manera más diferencial que otras (relación log2 bio / p = 6,64). De manera similar, las proteínas ustA, tpx, que están involucradas en la respuesta al estrés oxidativo se han sobreexpresado.

Entre las proteínas implicadas en el metabolismo y la biosíntesis, las proteínas FOLD, PGN\_0727, Fhs, PG\_1069, AckA, PGN\_1752, TyrS, PGN\_0713, PG\_1141, MetG, ProS fueron reprimidos en comparación con el estado planctónico. Por otro lado, una parte del proteínas del metabolismo y la biosíntesis, como Cob, Pgi, AcpP, PGN\_0830 fueron sobreexpresados en biofilm.

Además, 16,7% de las proteínas expresadas diferencialmente tenían una función desconocida, entre ellos 26,9% estaban sobreexpresadas y 20,6% reprimidas.

# *Discusión*

## Discusión

El conjunto de experimentos realizados en esta tesis ha servido para la identificación y el análisis del proteoma de tres bacterias orales relacionadas con la periodontitis (*A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*), a través de la comparación en estado planctónico frente al de biopelícula monoespecie.

Nuestra hipótesis resultó ser verdadera, cada de las bacterias ha mostrado un perfil de expresión diferencial, dependiendo del modo de crecimiento. Las proteínas identificadas pueden pertenecer a diferentes clases funcionales, entre ellas las proteínas relacionadas con el metabolismo energético (incluyendo el catabolismo de lípidos y carbohidratos), la organización del citoesqueleto, el crecimiento celular y las chaperonas moleculares (Wang y cols., 2009). Proteínas del metabolismo en las tres bacterias periodontales estaban reprimidas, esto es consistente con la reducida actividad metabólica y con la reducida tasa de crecimiento que ocurre en las biopelículas maduras (Donlan y Costerton, 2002; Rathsam y cols., 2005). Las bacterias que forman biopelículas son más virulentas que cuando crecen en el estado planctónico (Costerton y Wilson, 2004) por lo tanto expresión de las proteínas de virulencia, membrana externa, chaperonas estaban evaluadas. Las proteínas de la membrana externa de la biopelícula de *F. nucleatum* estaban reprimidas, en *A. actinomycetemcomitans* se demostró el comportamiento contrario es decir, sobreexpresión de las proteínas de la membrana externa (Pham y cols., 2010). Esto puede explicarse por el papel diferente de las proteínas de la membrana externa de *F. nucleatum* que actúan como proteínas receptoras para la agregación conjunta con otros patógenos orales como *P. gingivalis* (Kinder y Holt, 1993; Liu y cols., 2014). Dado que estas condiciones experimentales implican el crecimiento de una biopelícula monoespecie la falta de coagregación con otras especies bacterianas puede haber reprimido la expresión de estas proteínas. Esto también es una posible explicación de proteínas reprimidas de la membrana externa de *P. gingivalis*, es el hecho de que unas de las propiedades más destacables de *P. gingivalis*, es que su patogenicidad se expresa solo en comunidades microbianas mixtas (Gupta y cols., 2015).

Se va proporcionar a continuación información más detallada sobre cada una de las tres bacterias anteriormente mencionadas, haciendo una especial referencia a las

proteínas identificadas de manera diferencial, así como a los grupos funcionales a los que pertenecen

### ***I. Aggregatibacter actinomycetemcomitans***

En el estudio de la expresión diferencial de *A. actinomycetemcomitans* se han identificado 87 manchas proteicas, que señala a 50 proteínas diferenciales, lo que corresponde al 4% del proteoma conocido de *A. actinomycetemcomitans* (DSMZ 8324). Había 8 proteínas no identificadas debido a la falta de cantidad suficiente de proteína disponible.

Del total de las proteínas diferenciales, el 74% estaban reprimidas. Mientras que el 26% estaban sobreexpresadas. Las proteínas reprimidas fueron principalmente las implicadas en funciones de metabolismo, biosíntesis y transporte, lo que es consistente con una reducción de la actividad metabólica cuando se encuentran en las biopelículas maduras.

El 92% de las proteínas implicadas en el metabolismo están reprimidas, entre ellas destaca la enolasa, la fosfoglicerato quinasa o la fosfogliceromutasa. Solamente la dihidrolipoamida acetiltransferasa está sobreexpresada, siendo una proteína conocida como factor de longevidad metabólica (Easlon y cols., 2007).

Todas las proteínas implicadas en la biosíntesis de aminoácidos, cofactores, coenzimas, ácido graso estaban reprimidos en la biopelícula. Entre ellos la proteína piridoxamina quinasa, que está implicada en el metabolismo de la vitamina B-6 y puede servir como una posible diana para los agentes farmacológicos (McCormick y Chen, 1999).

Por otro lado, el 86% de las proteínas implicadas en transporte están reprimidas, concretamente, las involucradas en el transporte transmembrana de una amplia gama de moléculas, del hierro, aminoácidos, metal, arginina. Dadas las condiciones ambientales en la biopelícula la necesidad en este tipo de función parece estar reducida (Lefèvre y Boutry, 2018).

Dado que las bacterias que están formando la biopelícula han demostrado ser más virulentas que cuando crecen en condiciones planctónicas (Donlan y Costerton, 2002), se analizaron las proteínas sobreexpresadas para así, poder evaluar su posible papel como factores de virulencia. Entre ellas destacan:

- La dihidrolipoamida acetiltransferasa participa en el metabolismo y está descrita como fuertemente inmunogénica para *Mycoplasma mycoides subsp. capri*, tanto, que esta proteína se utiliza como el marcador diagnóstico para el síndrome “MAKePS”, causado por esta especie bacteriana (Corona y cols., 2013).
- Adenilato quinasa. Esta enzima participa en la biosíntesis de ADP. Xiao et al. han identificado la adenilato quinasa (ADK, Rv0733) de *Mycobacterium tuberculosis* como un antígeno que induce altas respuestas celulares y de anticuerpos en pacientes con tuberculosis activa (Xiao y cols., 2016).
- Chaperona GroEl. Esta proteína parece actuar directamente con las células de reabsorción ósea, como los osteoclastos (Meghji y cols., 1994; Wilson y Henderson, 1995). A través de este mecanismo, esta proteína se ha asociado con la resorción ósea y se ha identificado como factor de virulencia (Kieselbach y cols., 2015). De hecho, otros estudios han demostrado que *A. actinomycetemcomitans* se asocia a resorción ósea a través de diferentes mecanismos, como por su lipopolisacárido (Tani y cols., 1995) o el factor de la proteólisis en microvesículas (Nowotny y cols., 1982).
- Proteína de división celular (*FtsZ*). Esta proteína esencial pertenece a la familia del citoesqueleto, ya que forma un anillo citocinético en la mitad de la célula y está involucrado en la maquinaria de división que orchestra la división celular (Hurley y cols., 2016). Varios autores han destacado el carácter inmunogénico de esta proteína en *A. actinomycetemcomitans* y en otras bacterias (Nowalk y cols., 2006).
- Peroxiredoxinas son peroxidases de baja eficacia que utilizan tioles como reductores y se considera que determinan la virulencia de micobacterias y tripanosomátidos (Hofmann y cols., 2002). Kaihami y colaboradores han revelado el papel de la peroxiredoxina 1-Cys como un nuevo factor de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*, como mecanismo evasor de las defensas del huésped. Asimismo, otros autores también han descrito el papel inmunogénico de la proteína de la familia peroxiredoxina 2 en *A. actinomycetemcomitans* (Kaihami y cols., 2014).
- Las OMP son proteínas de superficie que cumplen funciones esenciales para la célula, entre ellos: la absorción de nutrientes, la adhesión celular, la



señalización celular y la exportación de residuos. Para las cepas patógenas, muchas de estas OMPs también sirven como factores de virulencia para la captación de nutrientes y la evasión de los mecanismos de defensa del huésped (Rollauer y cols., 2015).

## **II. *Fusobacterium nucleatum***

En el estudio 2 se han identificado un total de 62 manchas proteicas que han representado 49 proteínas únicas, lo que corresponde al 3% del proteoma conocido del *F. nucleatum* (DSM 20482), 6 proteínas no eran identificadas debido a la falta de cantidad suficiente de proteína disponible. De estas proteínas diferenciales, el 41% eran proteínas reprimidas y el 59% sobreexpresadas.

La mayoría de las proteínas reprimidas de *F. nucleatum* estaban involucradas en procesos de metabolismo y biosíntesis. Este hecho puede explicarse, ya que en estado de crecimiento de la biopelícula, las bacterias tienen una actividad metabólica reducida (Donlan y Costerton, 2002; Rathsam y cols., 2005; Sauer, 2003). Estos resultados son consistentes con otras investigaciones que también han estudiado la expresión diferencial de proteínas en bacterias que crecen en la biopelícula (Llama-Palacios y cols., 2017; Pham y cols., 2010). En esta investigación, las OMP (FomA, OMPA e OMPW) se reprimían cuando las bacterias crecían en estado de la biopelícula. En otros estudios, con otras bacterias, se ha reportado el comportamiento contrario, es decir, sobreexpresión de OMP al crecer en biofilm (Pham y cols., 2010). Esto puede explicarse por el papel diferente de las proteínas de la membrana externa en el biofilm de *F. nucleatum*. FomA ha sido reconocido como un inmunógeno importante de *F. nucleatum* (Bakken y cols., 1989; Mallison y cols., 1991), que actúa como una proteína receptora para la agregación conjunta con otras bacterias patógenas orales como *P. gingivalis* (Kinder y Holt, 1993; Liu y cols., 2010). Teniendo en cuenta que estas condiciones experimentales implican el crecimiento de la biopelícula monoespecie, la falta de coagregación con otras especies bacterianas puede haber reprimido la expresión de estas proteínas.

Cuando *F. nucleatum* creció como la biopelícula, las proteínas sobreexpresadas correspondían a proteínas implicadas en el transporte, transcripción, traducción, en el catabolismo del propanodiol y proteínas con función desconocida. La sobreexpresión de las proteínas implicadas en el transporte puede explicarse, ya que las comunidades

bacterianas sésiles pueden resistir mejor a los compuestos antimicrobianos (como los antibióticos) que sus contrapartes planctónicas no adheridas (Costerton y Wilson, 2004) y el sistema efflux de estas sustancias podría realizarse a través de ATP-binding cassette (ABC)(Vuotto y cols., 2017; Yoon y cols., 2015). Otros grupos de proteínas sobreexpresadas en el crecimiento del biofilm de *F. nucleatum* fueron las proteínas involucradas en la transcripción y traducción. Entre aquellas con función de transcripción, identificamos el represor LexA. La red SOS regulada por LexA es una respuesta bacteriana al daño del ADN de origen metabólico o ambiental. LexA también controla varios otros genes que codifican factores de virulencia. (Walter y cols., 2015). Esta proteína sobreexpresada está asociada con la formación de biopelículas en diferentes bacterias como *Clostridium difficile* (Walter y cols., 2015), *Clostridium ijundahlii* (Philips y cols., 2017), y *Pseudomonas aeruginosa* (Chellappa y cols., 2013).

La proteína NusG es un factor de elongación transcripcional bacteriano involucrado en la terminación y anti-terminación de la transcripción (Teh y cols., 2017). En *F. nucleatum*, el gen nusG se ha utilizado como el marcador para detectar estas bacterias en muestras clínicas de pacientes con cáncer colorrectal.

En cuanto a las proteínas implicadas en la traducción, las proteínas ribosómicas L3, L6 y L10 estaban sobreexpresadas. L6 es necesario para la síntesis de proteínas eficiente, por lo tanto, no es sorprendente que las células con L6 defectuosa crecería lentamente (Proctor y cols., 2014). Dado que a estas proteínas se les ha asignado un papel específico en la resistencia a los agentes antimicrobianos (Klitgaard y cols., 2015; Proctor y cols., 2014) y en la capacidad de adaptarse al estrés (Castro y cols., 2015), su sobreexpresión en el crecimiento de la biopelícula puede explicar la mayor resistencia a los compuestos antimicrobianos cuando las bacterias forman biopelículas (Stewart y Costerton, 2001).

Sobre las proteínas implicadas en el catabolismo del propanodiol, el operón pdu forma parte de una vía metabólica implicada en el metabolismo de la fucosa (Walter y cols., 1997). La capacidad de metabolizar la fucosa (un componente principal del moco intestinal) se ha asociado a la virulencia de las bacterias enteropatógenas, ya que proporciona una ventaja competitiva para la invasión, colonización y persistencia intestinal dentro de los macrófagos (Adkins y cols., 2006). Dado que varios autores han sugerido que la expresión de proteínas Pdu contribuye a la patogénesis de algunas

bacterias (Adkins y cols., 2006; Dogan y cols., 2014) y se correlaciona con una mayor invasión celular (Dogan y cols., 2014) probablemente, su sobreexpresión en *F. nucleatum* cuando crece en la biopelícula, puede justificar el aumento de la invasividad de esta bacteria cuando se encuentra en un estado de la biopelícula.

- Proteínas de la vía del butirato con expresión diferencial

La producción de ácido butírico como producto principal de la fermentación de glucosa y peptona, junto con los componentes lipídicos característicos, diferencia *Fusobacterium* de otros bacilos anaeróbicos, gramnegativos y no formadores de esporas (Bolstad y cols., 1996). La síntesis de butirato a partir de piruvato en *F. nucleatum* utilizando la base de datos de vías metabólicas de la Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto (KEGG) (Ogata y cols., 1999), se representa en la Figura 11.

De las siete enzimas involucradas en esta vía, seis se expresaron diferencialmente creciendo como la biopelícula vs. planctónico. Dado que prácticamente toda la vía está regulada por el estado de crecimiento (biopelícula o planctónico) en el que se encuentran las bacterias, pensamos que esta expresión diferencial puede ser importante para su virulencia. Si miramos otras bacterias, para *T. forsythia*, la vía de producción de butirato estaba marcadamente reprimida en la biopelícula, pero en este caso, las bacterias producen este metabolito como un producto final del metabolismo del glutamato y el aspartato (Pham y cols., 2010). En esta investigación, la expresión diferencial de las proteínas pertenecientes a la vía del butirato deriva del piruvato, y, por tanto, probablemente, tienen diferentes procesos de regulación. Jorth y cols utilizó muestras de pacientes sanos y enfermos emparejadas para comparar la expresión génica de 160.000 genes en comunidades periodontales sanas y enfermas. En las localizaciones enfermas se mostró una expresión génica aumentada, sobre todo asociada a vías específicas, tales como la fermentación de lisina a butirato y la fermentación de piruvato, y siendo estas vías relevantes en bacterias patógenas, probablemente contribuyan al proceso de la enfermedad (Jorth y cols., 2014). Estos autores atribuyeron a cambios en la expresión génica de *F. nucleatum* como relevantes durante la periodontitis, al producir un metabolito (butirato), que establece un entorno de crecimiento favorable para comunidades bacterianas asociadas a enfermedad, con el concomitante aumento de la producción de ácidos grasos de cadena corta como el butirato, que se han encontrado en tasas elevadas durante el inicio y la progresión de las enfermedades periodontales (Jorth y cols., 2014).

Además, se describió que el butirato y el propionato, productos finales del metabolismo de la placa dental, pueden tener un papel etiológico en las enfermedades periodontales (Singer y Buckner, 1981). El butirato afecta a la progresión del ciclo celular de los fibroblastos (Chang y cols., 2013), e inhiben la proliferación de linfocitos y la producción de citocinas (Kurita-Ochiai y cols., 1995). Todos estos factores pueden vincular los resultados de esta investigación con la patogenicidad de *F. nucleatum* cuando crece en estado de biopelícula.

También se sabe que *F. nucleatum* forma parte de la microbiota intestinal y mantiene la homeostasis intestinal regulando diversas actividades biológicas como barrera de la mucosa, funciones metabólicas e inmunológicas (Holmes y cols., 2012). Diferentes estudios han informado que *F. nucleatum* se encontró en concentraciones más altas en muestras de cáncer colorrectal en comparación con controles sanos (Kostic y cols., 2013; Mira-Pascual y cols., 2015). Además, el butirato tiene un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis intestinal y la integridad epitelial, ya que sirve como la principal fuente de energía para los colonocitos y juega un papel crítico en la salud y la enfermedad. El butirato se sintetiza a través del piruvato y la acetilcoenzima A, principalmente por la descomposición de polisacáridos complejos que escapan a la digestión en el tracto gastrointestinal superior y llegan al colon (Louis y Flint, 2009).

Toda esta información junto con la expresión diferencial de las enzimas que forman parte de la vía del butirato cuando de *F. nucleatum* forma la biopelícula, parecen indicar la importancia de la virulencia de esta bacteria tanto en las enfermedades periodontales como en los carcinomas colorrectales humanos.

### **III. *Porphyromonas gingivalis***

En esta investigación se han identificado un total de 602 proteínas, con un mínimo de dos péptidos, correspondientes al 29,8% del proteoma de *P. gingivalis* ATCC 33277. Entre este conjunto de proteínas, el 89% eran comunes a los proteomas de las muestras planctónicas y de biopelícula. 6,2% (37/602) de las proteínas se encontraron exclusivamente en el modo de crecimiento de biopelícula y 4,8% (29/602) en planctónico. Estos resultados están de acuerdo con los resultados de Favre

y colaboradores (Favre y cols., 2018) y significan que la mayoría de las proteínas eran comunes a ambos estados fisiológicos.

Las proteínas que eran únicas y sobreexpresadas en la biopelícula pertenecen a diferentes categorías funcionales, entre ellas proteína HagB, que ha sido implicada en la virulencia y juega un papel en la adherencia de los microorganismos orales a las superficies de los tejidos, lo cual es un evento inicial importante en la patogénesis de enfermedades, tanto orales como vasculares (Beck y cols., 2001; Progulske-Fox y cols., 1995; Song y cols., 2005) y su eliminación del genoma de ATCC33277 mostró una disminución de 10 veces en su capacidad de adhesión a las células H357, destacando que hagB juega un papel importante en la mediación de una adhesión estable, incluso en cepas fimbriadas (Connolly y cols., 2017; Katz y cols., 1999).

*Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 tiene dos tipos distintos de fimbrias compuestas por fimbrilinas, FimA (que median la colonización de los tejidos periodontales y la invasión de las células huésped, promueven la formación inicial de biopelículas monoespecies) (Amano y cols., 2004) y Mfa1 (tienen funciones supresoras y reguladoras durante el desarrollo de biopelículas homotípicas) (Kuboniwa y cols., 2009).

En el estudio 3, las proteínas de virulencia, menor fimbrium subunit Mfa1, menor fimbrium subunit Mfa3, Fimbrillin A, Fimbrillin C, mayor fimbrium subunit FimC, mayor fimbrium subunit FimE estaban reprimidas. Aunque estos resultados pueden parecer contradictorios, en el análisis comparativo de expresión génica de *P. gingivalis* ATCC 33277, realizado por nuestro grupo de investigación, uno de los componentes menores de las fimbrias A, apareció reprimido en la biopelícula (Romero-Lastra y cols., 2017).

La función del ribosoma consume hasta el 40% de la energía de la célula en bacterias de crecimiento rápido (Maguire, 2009). Es por ello en esta investigación, varias proteínas ribosomales (RplS, RplD, RpsB) y proteínas relacionadas con la función ribosómica (TSF, Rnr, RuvA) estaban sobreexpresadas o solo se identificaron en crecimiento en la biopelícula, lo que coincide con el estudio de Moon y cols (Moon y cols., 2014). Muchas proteínas ribosómicas pueden actuar como las proteínas autorreguladoras y pueden regular la producción de proteínas que pertenecen a diferentes subunidades. Por lo tanto, la proteína sobreexpresada L4 puede regular la producción de seis proteínas de su propia subunidad y cuatro de la

subunidad pequeña (Maguire, 2009). Aún se necesitan más estudios para explorar la síntesis de proteínas ribosómicas en *P. gingivalis*.

La enzima pantotenato sintetasa fue identificada en el modo de crecimiento de la biopelícula de *P. gingivalis*. La biosíntesis de pantotenato es esencial para la síntesis de la coenzima A y la proteína transportadora de acilo en *M. tuberculosis* y *S. aureus* (Devi y cols., 2015; Pradhan y Sinha, 2018; Wang y cols., 2019; Wang y Eisenberg, 2003). La sintetasa pantotenato (PanC) se ha identificado como una diana potencial para agentes antimicrobianos (Mdluli y Spigelman, 2006).

Otro grupo de interés forman las chaperonas, moléculas importantes, involucradas en el crecimiento y mantenimiento celular (Ellis y van der Vies, 1991). Entre ellos SlyD, una metalo-chaperona, sobreexpresada en este estudio, es una proteína bacteriana de dos dominios con actividades de peptidil-prolil isomerasa, unión de níquel y chaperona (Kovermann y cols., 2013; Scholz y cols., 2006). Debido a sus funciones celulares cruciales, las chaperonas podrían ser un nuevo objetivo y una nueva estrategia para contrarrestar la aparición de resistencia a múltiples fármacos (Kumar y Balbach, 2017).

Al mismo tiempo, la chaperona bacteriana proteína G (HtpG), un miembro de la familia de proteínas Hsp90, que participa en la protección de las células contra una variedad de estreses ambientales (Grudniak y cols., 2015) estaba reprimida, así como otra proteína del estrés oxidativo (SodB), lo que coincide con los datos reportados por nuestro grupo de investigación (Romero-Lastra y cols., 2017).

La proteína asociada a CRISPR (*the clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) fue identificada en el estado planctónico. Los sistemas asociados a CRISPR (Cas) proporcionan una inmunidad adaptativa basada en secuencias contra elementos genéticos móviles (Marraffini, 2015). Estudios recientes han demostrado que el sistema CRISPR / Cas, además de su función clásica está involucrado en la formación de las biopelículas, reparación de ADN, *quórum sensing* y evasión inmunitaria (Cady y O'Toole, 2011; Louwen y cols., 2014; Sampson y Weiss, 2014; Zegans y cols., 2009). Es importante destacar que la eliminación del gen cas3 en *Salmonella* la hizo menos patógena para las células del huésped (Cui y cols., 2020).

La proteína involucrada en la biosíntesis del lípido A, LpxK (*Tetraacyldisaccharide 4'-kinase*), se identificó en el modo de crecimiento planctónico de *P. gingivalis*. Es una enzima esencial sin rutas sintéticas alternativas, cuya concentración influye a una tasa de producción del lípido A (Emiola y cols.,

2014) y es una posible diana enzimática potencial para el desarrollo de agentes anti-Gram-negativos (Sawyer y cols., 2019; Wei y cols., 2017).

#### **IV. Limitaciones y dificultades de la investigación**

La limitación principal de las investigaciones proteómicas es la complejidad de las estructuras biológicas y los procesos fisiológicos de la cavidad oral, que es difícil de reproducir en un proceso experimental. Los tres estudios se han realizado con la presencia de una única bacteria por lo que la biopelícula era monoespecie. Con este tipo de estudios es muy difícil extrapolar los resultados obtenidos *in vitro* a *in vivo*, porque no se puede simular las condiciones complejas existentes en la cavidad oral.

Por otro lado, la cantidad de proteína que se obtiene procedente de la bacteria cuando está formando biopelícula es muy limitada. Por eso en el tercer estudio, en el estudio de expresión diferencial de *Porphyromonas gingivalis*, en vez de utilizar electroforesis bidimensional, hemos utilizado otra herramienta proteica, como la cromatografía multidimensional acoplada a la espectrometría de masas. Además la preparación de las muestras para un análisis proteómico es un trabajo delicado y requiere experiencia laboral.

#### **V. Implicaciones de la investigación**

Las herramientas proteómicas modernas pueden proveer un análisis global de las proteínas expresadas. Las proteínas son macromoléculas funcionales de las bacterias, que definen el fenotipo bacteriano y las funciones que realiza tanto dentro como fuera de la célula. La identificación y expresión diferencial de proteínas es importante para comprender su metabolismo la formación de biopelículas, la colonización e interacción con el huésped así como la existencia de factores de virulencia bacteriana específicos. Todo eso podría revelar nuevos conocimientos sobre las vías reguladoras centrales y las estrategias de adaptación del crecimiento de las biopelículas bacterianas y lo que es más importante, las proteínas son dianas preferidas para agentes terapéuticos y pruebas de diagnóstico, por lo que el análisis proteómico suministra de antígenos potenciales para vacunas y proteínas diana para el desarrollo de las nuevas estrategias de tratamiento.



# *Conclusiones*

## Conclusiones

Las bacterias orales relacionadas con la periodontitis (*A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*) demuestran una expresión protéica diferencial dependiendo de si se encuentran formando biopelícula o en un estado planctónico.

- Estudio 1: 87 proteínas de *A. actinomycetemcomitans* se expresaron diferencialmente, siendo 13 sobreexpresadas y 37 reprimidas. Las proteínas sobreexpresadas fueron OMPs y proteínas altamente inmunogénicas, las reprimidas fueron principalmente proteínas implicadas en el metabolismo, la biosíntesis y el transporte.
- Estudio 2: 68 proteínas de *F. nucleatum* se expresaron diferencialmente, siendo 20 proteínas reprimidas y 31 sobreexpresadas. Las proteínas reprimidas pertenecían al metabolismo, biosíntesis y eran proteínas de la membrana externa; y sobreexpresadas fueron proteínas implicadas en el metabolismo, transcripción, traducción, transporte y proteínas con función desconocida.
- Estudio 3: en total se identificaron 602 proteínas, 565 cuando *P. gingivalis* creció en estado planctónico y 573 en biopelícula, con 29 y 37 proteínas exclusivas, respectivamente. Las proteínas reprimidas participaron principalmente en el metabolismo, la biosíntesis y la síntesis de fimbrias y las proteínas sobreexpresadas participaron en la transducción, el estrés oxidativo y otras proteínas de función desconocida.

Se deben realizar más investigaciones para aclarar el papel de estas proteínas específicas en la virulencia de las bacterias periodontales y su uso potencial tanto en el diagnóstico como en el tratamiento de la periodontitis.

## **Bibliografia**

- Abe, K., 2012. Butyric acid induces apoptosis in both human monocytes and lymphocytes equivalently. *J. Oral Sci.* 54, 7–14. <https://doi.org/10.2334/josnusd.54.7>
- Åberg, C.H., Kelk, P., Johansson, A., 2014. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: Virulence of its leukotoxin and association with aggressive periodontitis. *Virulence* 6, 188–195. <https://doi.org/10.4161/21505594.2014.982428>
- Aboulnaga, E.-H., Pinkenburg, O., Schiffels, J., El-Refai, A., Buckel, W., Selmer, T., 2013. Effect of an oxygen-tolerant bifurcating butyryl coenzyme A dehydrogenase/electron-transferring flavoprotein complex from *Clostridium difficile* on butyrate production in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 195, 3704–3713. <https://doi.org/10.1128/JB.00321-13>
- Adkins, J.N., Mottaz, H.M., Norbeck, A.D., Gustin, J.K., Rue, J., Clauss, T.R.W., Purvine, S.O., Rodland, K.D., Heffron, F., Smith, R.D., 2006. Analysis of the *Salmonella typhimurium* proteome through environmental response toward infectious conditions. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 5, 1450–1461. <https://doi.org/10.1074/mcp.M600139-MCP200>
- Amano, A., Nakagawa, I., Okahashi, N., Hamada, N., 2004. Variations of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae in relation to microbial pathogenesis. *J. Periodontal Res.* 39, 136–142. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2004.00719.x>
- Baggerman, G., Vierstraete, E., De Loof, A., Schoofs, L., 2005. Gel-based versus gel-free proteomics: a review. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 8, 669–677. <https://doi.org/10.2174/138620705774962490>
- Bakken, V., Aarø, S., Hofstad, T., Vasstrand, E.N., 1989. Outer membrane proteins as major antigens of *Fusobacterium nucleatum*. *FEMS Microbiol. Immunol.* 1, 473–483. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1989.tb02438.x>
- Bao, K., Bostanci, N., Selevsek, N., Thurnheer, T., Belibasakis, G.N., 2015. Quantitative Proteomics Reveal Distinct Protein Regulations Caused by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* within Subgingival Biofilms. *PLoS ONE* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119222>
- Bartold, P.M., Lopez-Oliva, I., 2020. Periodontitis and rheumatoid arthritis: An update 2012-2017. *Periodontol.* 2000 83, 189–212. <https://doi.org/10.1111/prd.12300>
- Beck, J.D., Elter, J.R., Heiss, G., Couper, D., Mauriello, S.M., Offenbacher, S., 2001. Relationship of periodontal disease to carotid artery intima-media wall thickness: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 1816–1822. <https://doi.org/10.1161/hq1101.097803>
- Bolstad, A.I., Jensen, H.B., Bakken, V., 1996. Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. *Clin. Microbiol. Rev.* 9, 55–71.
- Brígido, J.-A., da Silveira, V.-R.-S., Rego, R.-O., Nogueira, N. -a.-P., 2014. Serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in relation to periodontal status and geographic origin of individuals-a review of the literature. *Med. Oral Patol. Oral Cirurgia Bucal* 19, e184-191. <https://doi.org/10.4317/medoral.19304>
- Brogan, J.M., Lally, E.T., Poulsen, K., Kilian, M., Demuth, D.R., 1994. Regulation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin expression: analysis of the

- promoter regions of leukotoxic and minimally leukotoxic strains. *Infect. Immun.* 62, 501–508. <https://doi.org/10.1128/IAI.62.2.501-508.1994>
- Brook, I., 1989. Direct and indirect pathogenicity of beta-lactamase-producing bacteria in mixed infections in children. *Crit. Rev. Microbiol.* 16, 161–180. <https://doi.org/10.3109/10408418909104470>
- Brunner, J., Scheres, N., El Idrissi, N.B., Deng, D.M., Laine, M.L., van Winkelhoff, A.J., Crielaard, W., 2010. The capsule of *Porphyromonas gingivalis* reduces the immune response of human gingival fibroblasts. *BMC Microbiol.* 10, 5. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-5>
- Cady, K.C., O'Toole, G.A., 2011. Non-identity-mediated CRISPR-bacteriophage interaction mediated via the Csy and Cas3 proteins. *J. Bacteriol.* 193, 3433–3445. <https://doi.org/10.1128/JB.01411-10>
- Castro, D., Cordeiro, I.B., Taquita, P., Eberlin, M.N., Garcia, J.S., Souza, G.H.M.F., Arruda, M.A.Z., Andrade, E.V., Filho, S.A., Crainey, J.L., Lozano, L.L., Nogueira, P.A., Orlandi, P.P., 2015. Proteomic analysis of *Chromobacterium violaceum* and its adaptability to stress. *BMC Microbiol.* 15. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0606-2>
- Chang, M.-C., Tsai, Y.-L., Chen, Y.-W., Chan, C.-P., Huang, C.-F., Lan, W.-C., Lin, C.-C., Lan, W.-H., Jeng, J.-H., 2013. Butyrate induces reactive oxygen species production and affects cell cycle progression in human gingival fibroblasts. *J. Periodontal Res.* 48, 66–73. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2012.01504.x>
- Chellappa, S.T., Maredia, R., Phipps, K., Haskins, W.E., Weitao, T., 2013. Motility of *Pseudomonas aeruginosa* contributes to SOS-inducible biofilm formation. *Res. Microbiol.* 164, 1019–1027. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.10.001>
- Citron, D.M., 2002. Update on the taxonomy and clinical aspects of the genus *fusobacterium*. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 35, S22–27. <https://doi.org/10.1086/341916>
- Connolly, E., Millhouse, E., Doyle, R., Culshaw, S., Ramage, G., Moran, G.P., 2017. The *Porphyromonas gingivalis* hemagglutinins HagB and HagC are major mediators of adhesion and biofilm formation. *Mol. Oral Microbiol.* 32, 35–47. <https://doi.org/10.1111/omi.12151>
- Corona, L., Cillara, G., Tola, S., 2013. Proteomic approach for identification of immunogenic proteins of *Mycoplasma mycoides subsp. capri*. *Vet. Microbiol.* 167, 434–439. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.08.024>
- Costerton, W.J., Wilson, M., 2004. Introducing Biofilms. *Biofilms* 1, 1–4. <https://doi.org/10.1017/S1479050504001164>
- Cugini, C., Klepac-Ceraj, V., Rackaityte, E., Riggs, J.E., Davey, M.E., 2013. *Porphyromonas gingivalis*: keeping the pathos out of the biont. *J. Oral Microbiol.* 5. <https://doi.org/10.3402/jom.v5i0.19804>
- Cui, L., Wang, X., Huang, D., Zhao, Y., Feng, J., Lu, Q., Pu, Q., Wang, Y., Cheng, G., Wu, M., Dai, M., 2020. CRISPR-cas3 of *Salmonella* Upregulates Bacterial Biofilm Formation and Virulence to Host Cells by Targeting Quorum-Sensing Systems. *Pathog. Basel Switz.* 9. <https://doi.org/10.3390/pathogens9010053>
- da Silva-Boghossian, C.M., do Souto, R.M., Luiz, R.R., Colombo, A.P.V., 2011. Association of red complex, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and non-oral bacteria with periodontal diseases. *Arch. Oral Biol.* 56, 899–906. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.02.009>
- Darveau, R.P., 2010. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 481–490. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2337>

- de Diego, I., Veillard, F., Sztukowska, M.N., Guevara, T., Potempa, B., Pomowski, A., Huntington, J.A., Potempa, J., Gomis-Rüth, F.X., 2014. Structure and mechanism of cysteine peptidase gingipain K (Kgp), a major virulence factor of *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis. *J. Biol. Chem.* 289, 32291–32302. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.602052>
- de Molon, R.S., Rossa Jr., C., Thurlings, R.M., Cirelli, J.A., Koenders, M.I., 2019. Linkage of Periodontitis and Rheumatoid Arthritis: Current Evidence and Potential Biological Interactions. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 4541. <https://doi.org/10.3390/ijms20184541>
- Devi, P.B., Jogula, S., Reddy, A.P., Saxena, S., Sridevi, J.P., Sriram, D., Yogeewari, P., 2015. Design of Novel *Mycobacterium tuberculosis* Pantothenate Synthetase Inhibitors: Virtual Screening, Synthesis and In Vitro Biological Activities. *Mol. Inform.* 34, 147–159. <https://doi.org/10.1002/minf.201400120>
- Dewhirst, F.E., Chen, T., Izard, J., Paster, B.J., Tanner, A.C.R., Yu, W.-H., Lakshmanan, A., Wade, W.G., 2010. The Human Oral Microbiome. *J. Bacteriol.* 192, 5002–5017. <https://doi.org/10.1128/JB.00542-10>
- Diaz, R., Ghofaily, L.A., Patel, J., Balashova, N.V., Freitas, A.C., Labib, I., Kachlany, S.C., 2006. Characterization of leukotoxin from a clinical strain of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Microb. Pathog.* 40, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2005.10.005>
- Doğan, B., Chen, J., Çiftlikli, S.Y., Huang, J., Kadir, T., Alniak, A.K., Chen, C., 2016. Occurrence and serotype distribution of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in subjects without periodontitis in Turkey. *Arch. Oral Biol.* 61, 125–129. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.10.023>
- Dogan, B., Suzuki, H., Herlekar, D., Sartor, R.B., Campbell, B.J., Roberts, C.L., Stewart, K., Scherl, E.J., Araz, Y., Bitar, P.P., Lefébure, T., Chandler, B., Schukken, Y.H., Stanhope, M.J., Simpson, K.W., 2014. Inflammation-associated adherent-invasive *Escherichia coli* are enriched in pathways for use of propanediol and iron and M-cell translocation. *Inflamm. Bowel Dis.* 20, 1919–1932. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000183>
- Donlan, R.M., Costerton, J.W., 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 167–193. <https://doi.org/10.1128/cmr.15.2.167-193.2002>
- Easlon, E., Tsang, F., Diloova, I., Wang, C., Lu, S.-P., Skinner, C., Lin, S.-J., 2007. The dihydrolipoamide acetyltransferase is a novel metabolic longevity factor and is required for calorie restriction mediated life span extension. *J. Biol. Chem.* 282, 6161–6171. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607661200>
- Ellis, R.J., van der Vies, S.M., 1991. Molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* 60, 321–347. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.60.070191.001541>
- Emiola, A., George, J., Andrews, S.S., 2014. A Complete Pathway Model for Lipid A Biosynthesis in *Escherichia coli*. *PloS One* 10, e0121216. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121216>
- Fabrizi, S., León, R., Blanc, V., Herrera, D., Sanz, M., 2013. Variability of the fimA gene in *Porphyromonas gingivalis* isolated from periodontitis and non-periodontitis patients. *Med. Oral Patol. Oral Cirugia Bucal* 18, e100-105. <https://doi.org/10.4317/medoral.18042>
- Favre, L., Ortalo-Magné, A., Pichereaux, C., Gargaros, A., Burlet-Schiltz, O., Cotellet, V., Culioli, G., 2018. Metabolome and proteome changes between biofilm and planktonic phenotypes of the marine bacterium *Pseudoalteromonas lipolytica*

- TC8. Biofouling 34, 132–148.  
<https://doi.org/10.1080/08927014.2017.1413551>
- Feng, Z., Weinberg, A., 2006. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. *Periodontol.* 2000 40, 50–76. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2005.00148.x>
- Fine, D.H., Kaplan, J.B., Kachlany, S.C., Schreiner, H.C., 2006. How we got attached to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: A model for infectious diseases. *Periodontol.* 2000 42, 114–157. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2006.00189.x>
- Fux, C.A., Costerton, J.W., Stewart, P.S., Stoodley, P., 2005. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.* 13, 34–40.  
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.010>
- Genco, C.A., 1995. Regulation of Hemin and Iron Transport in *Porphyromonas Gingivalis*. *Adv. Dent. Res.* 9, 41–47.  
<https://doi.org/10.1177/08959374950090010801>
- Genco, R.J., Borgnakke, W.S., 2020. Diabetes as a potential risk for periodontitis: association studies. *Periodontol.* 2000 83, 40–45.  
<https://doi.org/10.1111/prd.12270>
- Genco, R.J., Sanz, M., 2020. Clinical and public health implications of periodontal and systemic diseases: An overview. *Periodontol.* 2000 83, 7–13.  
<https://doi.org/10.1111/prd.12344>
- Grenier, D., Grignon, L., 2006. Response of human macrophage-like cells to stimulation by *Fusobacterium nucleatum ssp. nucleatum* lipopolysaccharide. *Oral Microbiol. Immunol.* 21, 190–196. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2006.00278.x>
- Grudniak, A.M., Markowska, K., Wolska, K.I., 2015. Interactions of *Escherichia coli* molecular chaperone HtpG with DnaA replication initiator DNA. *Cell Stress Chaperones* 20, 951–957. <https://doi.org/10.1007/s12192-015-0623-y>
- Gupta, A., Govila, V., Saini, A., 2015. Proteomics – The research frontier in periodontics. *J. Oral Biol. Craniofacial Res.* 5, 46–52.  
<https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.01.001>
- Haase, E.M., Zmuda, J.L., Scannapieco, F.A., 1999. Identification and molecular analysis of rough-colony-specific outer membrane proteins of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect. Immun.* 67, 2901–2908.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.67.6.2901-2908.1999>
- Hajishengallis, G., Darveau, R.P., Curtis, M.A., 2012. The Keystone Pathogen Hypothesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 717–725.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2873>
- Hajishengallis, G., Liang, S., Payne, M.A., Hashim, A., Jotwani, R., Eskin, M.A., McIntosh, M.L., Alsam, A., Kirkwood, K.L., Lambris, J.D., Darveau, R.P., Curtis, M.A., 2011. A Low-Abundance Biofilm Species Orchestrates Inflammatory Periodontal Disease through the Commensal Microbiota and the Complement Pathway. *Cell Host Microbe* 10, 497–506.  
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.10.006>
- Hammond, B.F., Lillard, S.E., Stevens, R.H., 1987. A bacteriocin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect. Immun.* 55, 686–691.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.55.3.686-691.1987>
- Han, Y.W., 2015. *Fusobacterium nucleatum*: a commensal-turned pathogen. *Curr. Opin. Microbiol.* 0, 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.11.013>

- Han, Y.W., Ikegami, A., Rajanna, C., Kawsar, H.I., Zhou, Y., Li, M., Sojar, H.T., Genco, R.J., Kuramitsu, H.K., Deng, C.X., 2005. Identification and Characterization of a Novel Adhesin Unique to Oral *Fusobacteria*. *J. Bacteriol.* 187, 5330–5340. <https://doi.org/10.1128/JB.187.15.5330-5340.2005>
- Hartmanis, M.G.N., Gatenbeck, S., 1984. Intermediary Metabolism in *Clostridium acetobutylicum*: Levels of Enzymes Involved in the Formation of Acetate and Butyrate. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 1277–1283.
- Haubek, D., 2010. The highly leukotoxic JP2 clone of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: evolutionary aspects, epidemiology and etiological role in aggressive periodontitis. *APMIS. Suppl.* 1–53. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2010.02665.x>
- Henderson, B., Ward, J.M., Ready, D., 2010. *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*: a triple A\* periodontopathogen? *Periodontol.* 2000 54, 78–105. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2009.00331.x>
- Hofmann, B., Hecht, H.-J., Flohé, L., 2002. Peroxiredoxins. *Biol. Chem.* 383, 347–364. <https://doi.org/10.1515/BC.2002.040>
- Holmes, E., Li, J.V., Marchesi, J.R., Nicholson, J.K., 2012. Gut microbiota composition and activity in relation to host metabolic phenotype and disease risk. *Cell Metab.* 16, 559–564. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.10.007>
- Holt, S.C., Ebersole, J.L., 2005. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the “red complex”, a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol.* 2000 38, 72–122. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2005.00113.x>
- Huang, S., Yang, Z., Zou, D., Dong, D., Liu, A., Liu, W., Huang, L., 2016. Rapid detection of nusG and fadA in *Fusobacterium nucleatum* by loop-mediated isothermal amplification. *J. Med. Microbiol.* 65, 760–769. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000300>
- Hurley, K.A., Santos, T.M.A., Nepomuceno, G.M., Huynh, V., Shaw, J.T., Weibel, D.B., 2016. Targeting the Bacterial Division Protein FtsZ. *J. Med. Chem.* 59, 6975–6998. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01098>
- Imamura, T., 2003. The role of gingipains in the pathogenesis of periodontal disease. *J. Periodontol.* 74, 111–118. <https://doi.org/10.1902/jop.2003.74.1.111>
- Irshad, M., van der Reijden, W.A., Crielaard, W., Laine, M.L., 2012. In vitro invasion and survival of *Porphyromonas gingivalis* in gingival fibroblasts; role of the capsule. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 60, 469–476. <https://doi.org/10.1007/s00005-012-0196-8>
- Ji, S., Shin, J.E., Kim, Y.C., Choi, Y., 2010. Intracellular degradation of *Fusobacterium nucleatum* in human gingival epithelial cells. *Mol. Cells* 30, 519–526. <https://doi.org/10.1007/s10059-010-0142-8>
- Johansson, A., 2011. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Leukotoxin: A Powerful Tool with Capacity to Cause Imbalance in the Host Inflammatory Response. *Toxins* 3, 242–259. <https://doi.org/10.3390/toxins3030242>
- Jorth, P., Turner, K.H., Gumus, P., Nizam, N., Buduneli, N., Whiteley, M., 2014. Metatranscriptomics of the human oral microbiome during health and disease. *mBio* 5, e01012-01014. <https://doi.org/10.1128/mBio.01012-14>
- Kaihami, G.H., Almeida, J.R.F. de, Santos, S.S. dos, Netto, L.E.S., Almeida, S.R. de, Baldini, R.L., 2014. Involvement of a 1-Cys peroxiredoxin in bacterial virulence. *PLoS Pathog.* 10, e1004442. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004442>

- Kassebaum, N.J., Bernabé, E., Dahiya, M., Bhandari, B., Murray, C.J.L., Marcenes, W., 2014. Global Burden of Severe Periodontitis in 1990-2010. *J. Dent. Res.* 93, 1045–1053. <https://doi.org/10.1177/0022034514552491>
- Katz, J., Black, K.P., Michalek, S.M., 1999. Host responses to recombinant hemagglutinin B of *Porphyromonas gingivalis* in an experimental rat model. *Infect. Immun.* 67, 4352–4359.
- Kieselbach, T., Zijnga, V., Granström, E., Oscarsson, J., 2015. Proteomics of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Outer Membrane Vesicles. *PLoS ONE* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138591>
- Kiley, P., Holt, S.C., 1980. Characterization of the lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 and N27. *Infect. Immun.* 30, 862–873.
- Kinder, S.A., Holt, S.C., 1993. Localization of the *Fusobacterium nucleatum* T18 adhesin activity mediating coaggregation with *Porphyromonas gingivalis* T22. *J. Bacteriol.* 175, 840–850. <https://doi.org/10.1128/jb.175.3.840-850.1993>
- Kistler, J.O., Booth, V., Bradshaw, D.J., Wade, W.G., 2013. Bacterial community development in experimental gingivitis. *PloS One* 8, e71227. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071227>
- Klitgaard, R.N., Ntokou, E., Nørgaard, K., Biltoft, D., Hansen, L.H., Trædholm, N.M., Kongsted, J., Vester, B., 2015. Mutations in the Bacterial Ribosomal Protein L3 and Their Association with Antibiotic Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 3518–3528. <https://doi.org/10.1128/AAC.00179-15>
- Kolenbrander, P.E., Palmer, R.J., Rickard, A.H., Jakubovics, N.S., Chalmers, N.I., Diaz, P.I., 2006. Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol.* 2000 42, 47–79. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2006.00187.x>
- Kook, J.-K., Park, S.-N., Lim, Y.K., Cho, E., Jo, E., Roh, H., Shin, Y., Paek, J., Kim, H.-S., Kim, H., Shin, J.H., Chang, Y.-H., 2017. Genome-Based Reclassification of *Fusobacterium nucleatum* Subspecies at the Species Level. *Curr. Microbiol.* 74, 1137–1147. <https://doi.org/10.1007/s00284-017-1296-9>
- Kostic, A.D., Chun, E., Robertson, L., Glickman, J.N., Gallini, C.A., Michaud, M., Clancy, T.E., Chung, D.C., Lochhead, P., Hold, G.L., El-Omar, E.M., Brenner, D., Fuchs, C.S., Meyerson, M., Garrett, W.S., 2013. *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell Host Microbe* 14, 207–215. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.07.007>
- Kovermann, M., Schmid, F.X., Balbach, J., 2013. Molecular function of the prolyl cis/trans isomerase and metallochaperone SlyD. *Biol. Chem.* 394, 965–975. <https://doi.org/10.1515/hsz-2013-0137>
- Kuboniwa, M., Hendrickson, E.L., Xia, Q., Wang, T., Xie, H., Hackett, M., Lamont, R.J., 2009. Proteomics of *Porphyromonas gingivalis* within a model oral microbial community. *BMC Microbiol.* 9, 98. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-98>
- Kumar, A., Balbach, J., 2017. Targeting the molecular chaperone SlyD to inhibit bacterial growth with a small molecule. *Sci. Rep.* 7. <https://doi.org/10.1038/srep42141>
- Kurita-Ochiai, T., Fukushima, K., Ochiai, K., 1995. Volatile fatty acids, metabolic by-products of periodontopathic bacteria, inhibit lymphocyte proliferation and cytokine production. *J. Dent. Res.* 74, 1367–1373. <https://doi.org/10.1177/00220345950740070801>



- Laine, M.L., Appelmeik, B.J., van Winkelhoff, A.J., 1997. Prevalence and distribution of six capsular serotypes of *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis patients. *J. Dent. Res.* 76, 1840–1844. <https://doi.org/10.1177/00220345970760120601>
- Lamont, R.J., Jenkinson, H.F., 1998. Life Below the Gum Line: Pathogenic Mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 1244–1263.
- Lau, L., Sanz, M., Herrera, D., Morillo, J.M., Martín, C., Silva, A., 2004. Quantitative real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two methods for the detection and quantification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in subgingival plaque samples. *J. Clin. Periodontol.* 31, 1061–1069. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2004.00616.x>
- Lefèvre, F., Boutry, M., 2018. Towards Identification of the Substrates of ATP-Binding Cassette Transporters1[OPEN]. *Plant Physiol.* 178, 18–39. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00325>
- Liu, P., Liu, Y., Wang, J., Guo, Y., Zhang, Y., Xiao, S., 2014. Detection of *Fusobacterium Nucleatum* and fadA Adhesin Gene in Patients with Orthodontic Gingivitis and Non-Orthodontic Periodontal Inflammation. *PLoS ONE* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085280>
- Liu, P.-F., Shi, W., Zhu, W., Smith, J.W., Hsieh, S.-L., Gallo, R.L., Huang, C.-M., 2010. Vaccination targeting surface FomA of *Fusobacterium nucleatum* against bacterial co-aggregation: Implication for treatment of periodontal infection and halitosis. *Vaccine* 28, 3496–3505. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.02.047>
- Llama-Palacios, A., Potupa, O., Sánchez, M.C., Figuero, E., Herrera, D., Sanz, M., 2017. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Growth in Biofilm versus Planktonic State: Differential Expression of Proteins. *J. Proteome Res.* 16, 3158–3167. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00127>
- Loozen, G., Ozcelik, O., Boon, N., De Mol, A., Schoen, C., Quirynen, M., Teughels, W., 2014. Inter-bacterial correlations in subgingival biofilms: a large-scale survey. *J. Clin. Periodontol.* 41, 1–10. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12167>
- Louis, P., Flint, H.J., 2009. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiol. Lett.* 294, 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01514.x>
- Lourenço, T.G.B., Heller, D., Silva-Boghossian, C.M., Cotton, S.L., Paster, B.J., Colombo, A.P.V., 2014. Microbial signature profiles of periodontally healthy and diseased patients. *J. Clin. Periodontol.* 41, 1027–1036. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12302>
- Louwen, R., Staals, R.H.J., Endtz, H.P., van Baarlen, P., van der Oost, J., 2014. The role of CRISPR-Cas systems in virulence of pathogenic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 78, 74–88. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00039-13>
- Maguire, B.A., 2009. Inhibition of bacterial ribosome assembly: a suitable drug target? *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 73, 22–35. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00030-08>
- Mallison, S.M., Smith, J.P., Schenkein, H.A., Tew, J.G., 1991. Accumulation of plasma cells in inflamed sites: effects of antigen, nonspecific microbial activators, and chronic inflammation. *Infect. Immun.* 59, 4019–4025.

- Manji, F., Dahlen, G., Fejerskov, O., 2018. Caries and Periodontitis: Contesting the Conventional Wisdom on Their Aetiology. *Caries Res.* 52, 548–564. <https://doi.org/10.1159/000488948>
- Marraffini, L.A., 2015. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. *Nature* 526, 55–61. <https://doi.org/10.1038/nature15386>
- Marsh, P.D., 2005. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *J. Clin. Periodontol.* 32 Suppl 6, 7–15. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2005.00790.x>
- McCormick, D.B., Chen, H., 1999. Update on interconversions of vitamin B-6 with its coenzyme. *J. Nutr.* 129, 325–327. <https://doi.org/10.1093/jn/129.2.325>
- Mdluli, K., Spigelman, M., 2006. Novel targets for tuberculosis drug discovery. *Curr. Opin. Pharmacol., Anti-infectives/New Technologies* 6, 459–467. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2006.06.004>
- Meghji, S., Wilson, M., Barber, P., Henderson, B., 1994. Bone resorbing activity of surface-associated material from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Eikenella corrodens*. *J. Med. Microbiol.* 41, 197–203. <https://doi.org/10.1099/00222615-41-3-197>
- Meyer, D.H., Fives-Taylor, P.M., 1994. Characteristics of adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to epithelial cells. *Infect. Immun.* 62, 928–935.
- Mínguez, M., Pousa, X., Herrera, D., Blasi, A., Sánchez, M.C., León, R., Sanz, M., 2014. Characterization and serotype distribution of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* isolated from a population of periodontitis patients in Spain. *Arch. Oral Biol.* 59, 1359–1367. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.07.021>
- Mintz, K.P., Fives-Taylor, P.M., 1999. Binding of the periodontal pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to extracellular matrix proteins. *Oral Microbiol. Immunol.* 14, 109–116. <https://doi.org/10.1034/j.1399-302X.1999.140206.x>
- Mira-Pascual, L., Cabrera-Rubio, R., Ocon, S., Costales, P., Parra, A., Suarez, A., Moris, F., Rodrigo, L., Mira, A., Collado, M.C., 2015. Microbial mucosal colonic shifts associated with the development of colorectal cancer reveal the presence of different bacterial and archaeal biomarkers. *J. Gastroenterol.* 50, 167–179. <https://doi.org/10.1007/s00535-014-0963-x>
- Moon, J.-H., Lee, J.-H., Lee, J.-Y., 2014. Microarray analysis of the transcriptional responses of *Porphyromonas gingivalis* to polyphosphate. *BMC Microbiol.* 14, 218. <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0218-2>
- Moore, W.E.C., Moore, L.V.H., 1994. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol.* 2000 5, 66–77. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1994.tb00019.x>
- Murakami, S., Mealey, B.L., Mariotti, A., Chapple, I.L.C., 2018. Dental plaque-induced gingival conditions. *J. Periodontol.* 89 Suppl 1, S17–S27. <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0095>
- Niederman, R., Buyle-Bodin, Y., Lu, B.-Y., Robinson, P., Naleway, C., 2016. Short-chain Carboxylic Acid Concentration in Human Gingival Crevicular Fluid: *J. Dent. Res.* <https://doi.org/10.1177/00220345970760010801>
- Nørskov-Lauritsen, N., Kilian, M., 2006. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus*

- comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 2135–2146. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64207-0>
- Nowalk, A.J., Gilmore, R.D., Carroll, J.A., 2006. Serologic Proteome Analysis of *Borrelia burgdorferi* Membrane-Associated Proteins. *Infect. Immun.* 74, 3864–3873. <https://doi.org/10.1128/IAI.00189-06>
- Nowotny, A., Behling, U.H., Hammond, B., Lai, C.H., Listgarten, M., Pham, P.H., Sanavi, F., 1982. Release of toxic microvesicles by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect. Immun.* 37, 151–154.
- Ogata, H., Goto, S., Sato, K., Fujibuchi, W., Bono, H., Kanehisa, M., 1999. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* 27, 29–34. <https://doi.org/10.1093/nar/27.1.29>
- Olsen, I., Shah, H.N., Gharbia, S.E., 1999. Taxonomy and biochemical characteristics of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol.* 2000 20, 14–52. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1999.tb00156.x>
- Orlandi, M., Graziani, F., D’Aiuto, F., 2020. Periodontal therapy and cardiovascular risk. *Periodontol.* 2000 83, 107–124. <https://doi.org/10.1111/prd.12299>
- Papapanou, P.N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., Fine, D.H., Flemmig, T.F., Garcia, R., Giannobile, W.V., Graziani, F., Greenwell, H., Herrera, D., Kao, R.T., Kebschull, M., Kinane, D.F., Kirkwood, K.L., Kocher, T., Kornman, K.S., Kumar, P.S., Loos, B.G., Machtei, E., Meng, H., Mombelli, A., Needleman, I., Offenbacher, S., Seymour, G.J., Teles, R., Tonetti, M.S., 2018. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J. Periodontol.* 89 Suppl 1, S173–S182. <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0721>
- Park, O.-J., Yi, H., Jeon, J.H., Kang, S.-S., Koo, K.-T., Kum, K.-Y., Chun, J., Yun, C.-H., Han, S.H., 2015. Pyrosequencing Analysis of Subgingival Microbiota in Distinct Periodontal Conditions. *J. Dent. Res.* 94, 921–927. <https://doi.org/10.1177/0022034515583531>
- Paster, B.J., Boches, S.K., Galvin, J.L., Ericson, R.E., Lau, C.N., Levanos, V.A., Sahasrabudhe, A., Dewhirst, F.E., 2001. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J. Bacteriol.* 183, 3770–3783. <https://doi.org/10.1128/JB.183.12.3770-3783.2001>
- Petersen, P.E., Ogawa, H., 2012. The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control. *Periodontol.* 2000 60, 15–39. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2011.00425.x>
- Pham, T.K., Roy, S., Noirel, J., Douglas, I., Wright, P.C., Stafford, G.P., 2010. A quantitative proteomic analysis of biofilm adaptation by the periodontal pathogen *Tannerella forsythia*. *Proteomics* 10, 3130–3141. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900448>
- Philips, J., Rabaey, K., Lovley, D.R., Vargas, M., 2017. Biofilm Formation by *Clostridium ljungdahlii* Is Induced by Sodium Chloride Stress: Experimental Evaluation and Transcriptome Analysis. *PLoS ONE* 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170406>
- Polak, D., Sanui, T., Nishimura, F., Shapira, L., 2020. Diabetes as a risk factor for periodontal disease-plausible mechanisms. *Periodontol.* 2000 83, 46–58. <https://doi.org/10.1111/prd.12298>

- Pradhan, S., Sinha, C., 2018. High throughput screening against pantothenate synthetase identifies amide inhibitors against *Mycobacterium tuberculosis* and *Staphylococcus aureus*. *Silico Pharmacol.* 6, 9. <https://doi.org/10.1007/s40203-018-0046-4>
- Pradhan-Palikhe, P., Mäntylä, P., Paju, S., Buhlin, K., Persson, G.R., Nieminen, M.S., Sinisalo, J., Pussinen, P.J., 2013. Subgingival bacterial burden in relation to clinical and radiographic periodontal parameters. *J. Periodontol.* 84, 1809–1817. <https://doi.org/10.1902/jop.2013.120537>
- Proctor, R.A., Kriegeskorte, A., Kahl, B.C., Becker, K., Löffler, B., Peters, G., 2014. *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants (SCVs): a road map for the metabolic pathways involved in persistent infections. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4, 99. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00099>
- Progulske-Fox, A., Tumwasorn, S., Lépine, G., Whitlock, J., Savett, D., Ferretti, J.J., Banas, J.A., 1995. The cloning, expression and sequence analysis of a second *Porphyromonas gingivalis* gene that codes for a protein involved in hemagglutination. *Oral Microbiol. Immunol.* 10, 311–318. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.1995.tb00160.x>
- Rathsam, C., Eaton, R.E., Simpson, C.L., Browne, G.V., Berg, T., Harty, D.W.S., Jacques, N.A., 2005. Up-regulation of competence- but not stress-responsive proteins accompanies an altered metabolic phenotype in *Streptococcus mutans* biofilms. *Microbiol. Read. Engl.* 151, 1823–1837. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27830-0>
- Reyes, L., Herrera, D., Kozarov, E., Roldán, S., Progulske-Fox, A., 2013. Periodontal bacterial invasion and infection: contribution to atherosclerotic pathology. *J. Clin. Periodontol.* 40 Suppl 14, S30-50. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12079>
- Rollauer, S.E., Soorashjani, M.A., Noinaj, N., Buchanan, S.K., 2015. Outer membrane protein biogenesis in Gram-negative bacteria. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 370. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0023>
- Romero-Lastra, P., Sánchez, Mc., Ribeiro-Vidal, H., Llama-Palacios, A., Figuero, E., Herrera, D., Sanz, M., 2017. Comparative gene expression analysis of *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 in planktonic and biofilms states. *PLOS ONE* 12, e0174669. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174669>
- Rudney, J.D., Chen, R., Sedgewick, G.J., 2001. Intracellular *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in buccal epithelial cells collected from human subjects. *Infect. Immun.* 69, 2700–2707. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.4.2700-2707.2001>
- Rylev, M., Kilian, M., 2008. Prevalence and distribution of principal periodontal pathogens worldwide. *J. Clin. Periodontol.* 35, 346–361. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01280.x>
- Saito, T., Ishihara, K., Ryu, M., Okuda, K., Sakurai, K., 2010. Fimbriae-associated genes are biofilm-forming factors in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* strains. *Bull. Tokyo Dent. Coll.* 51, 145–150. <https://doi.org/10.2209/tdcpublish.51.145>
- Sampson, T.R., Weiss, D.S., 2014. CRISPR-Cas systems: new players in gene regulation and bacterial physiology. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00037>
- Sauer, K., 2003. The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biol.* 4, 219. <https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-6-219>
- Sawyer, W.S., Wang, L., Uehara, T., Tamrakar, P., Prathapam, R., Mostafavi, M., Metzger, L.E., Feng, B., Baxter Rath, C.M., 2019. Targeted

- lipopolysaccharide biosynthetic intermediate analysis with normal-phase liquid chromatography mass spectrometry. *PloS One* 14, e0211803. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211803>
- Scholz, C., Eckert, B., Hagn, F., Schaarschmidt, P., Balbach, J., Schmid, F.X., 2006. SlyD proteins from different species exhibit high prolyl isomerase and chaperone activities. *Biochemistry* 45, 20–33. <https://doi.org/10.1021/bi051922n>
- Sechi, S., Chait, B.T., 2000. A Method To Define the Carboxyl Terminal of Proteins. *Anal. Chem.* 72, 3374–3378. <https://doi.org/10.1021/ac000045i>
- Sharma, A., Inagaki, S., Sigurdson, W., Kuramitsu, H.K., 2005. Synergy between *Tannerella forsythia* and *Fusobacterium nucleatum* in biofilm formation. *Oral Microbiol. Immunol.* 20, 39–42. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2004.00175.x>
- Signat, B., Roques, C., Poulet, P., Duffaut, D., 2011. *Fusobacterium nucleatum* in periodontal health and disease. *Curr. Issues Mol. Biol.* 13, 25–36.
- Singer, R.E., Buckner, B.A., 1981. Butyrate and propionate: important components of toxic dental plaque extracts. *Infect. Immun.* 32, 458–463. <https://doi.org/10.1128/IAI.32.2.458-463.1981>
- Singh, A., Wyant, T., Anaya-Bergman, C., Aduse-Opoku, J., Brunner, J., Laine, M.L., Curtis, M.A., Lewis, J.P., 2011. The capsule of *Porphyromonas gingivalis* leads to a reduction in the host inflammatory response, evasion of phagocytosis, and increase in virulence. *Infect. Immun.* 79, 4533–4542. <https://doi.org/10.1128/IAI.05016-11>
- Slots, J., 1977. Microflora in the healthy gingival sulcus in man. *Scand. J. Dent. Res.* 85, 247–254. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.1977.tb00560.x>
- Smith, K.P., Ruiz, T., Mintz, K.P., 2016. Inner-membrane protein MorC is involved in fimbriae production and biofilm formation in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Microbiol. Read. Engl.* 162, 513–525. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000246>
- Socransky, S.S., Haffajee, A.D., Cugini, M.A., Smith, C., Kent, R.L., 1998. Microbial complexes in subgingival plaque. *J. Clin. Periodontol.* 25, 134–144. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1998.tb02419.x>
- Song, H., Bélanger, M., Whitlock, J., Kozarov, E., Progulske-Fox, A., 2005. Hemagglutinin B Is Involved in the Adherence of *Porphyromonas gingivalis* to Human Coronary Artery Endothelial Cells. *Infect. Immun.* 73, 7267–7273. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.11.7267-7273.2005>
- Stern, J.R., 1956. Optical properties of aceto-acetyl-S-coenzyme A and its metal chelates. *J. Biol. Chem.* 221, 33–44.
- Stewart, P.S., Costerton, J.W., 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet Lond. Engl.* 358, 135–138. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(01\)05321-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(01)05321-1)
- Takada, K., Saito, M., Tsuzukibashi, O., Kawashima, Y., Ishida, S., Hirasawa, M., 2010. Characterization of a new serotype g isolate of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Mol. Oral Microbiol.* 25, 200–206. <https://doi.org/10.1111/j.2041-1014.2010.00572.x>
- Tani, Y., Tani, M., Yamada, T., Kato, I., 1995. Extracellular Antigens of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 in Severe Alveolar Bone Loss Patients Studied by Two-Dimensional Electrophoresis and Western Blots. *Microbiol. Immunol.* 39, 261–268. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1995.tb02199.x>

- Teh, A.H.T., Lee, S.M., Dykes, G.A., 2017. Identification of potential *Campylobacter jejuni* genes involved in biofilm formation by EZ-Tn5 Transposome mutagenesis. BMC Res. Notes 10. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2504-1>
- Uitto, V.-J., Baillie, D., Wu, Q., Gendron, R., Grenier, D., Putnins, E.E., Kanervo, A., Firth, J.D., 2005. *Fusobacterium nucleatum* Increases Collagenase 3 Production and Migration of Epithelial Cells. Infect. Immun. 73, 1171–1179. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.2.1171-1179.2005>
- V, B., Hb, J., 1986. Outer membrane proteins of *Fusobacterium nucleatum* Fev1. J. Gen. Microbiol. 132, 1069–1078. <https://doi.org/10.1099/00221287-132-4-1069>
- van Steenberg, T.J., van Winkelhoff, A.J., de Graaff, J., 1984. Pathogenic synergy: mixed infections in the oral cavity. Antonie Van Leeuwenhoek 50, 789–798. <https://doi.org/10.1007/BF02386241>
- Velden, U. van der, Amaliya, A., Loos, B.G., Timmerman, M.F., Weijden, F.A. van der, Winkel, E.G., Abbas, F., 2015. Java project on periodontal diseases: causes of tooth loss in a cohort of untreated individuals. J. Clin. Periodontol. 42, 824–831. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12446>
- Vuotto, C., Longo, F., Pascolini, C., Donelli, G., Balice, M.P., Libori, M.F., Tiracchia, V., Salvia, A., Varaldo, P.E., 2017. Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. J. Appl. Microbiol. 123, 1003–1018. <https://doi.org/10.1111/jam.13533>
- Walter, B.M., Cartman, S.T., Minton, N.P., Butala, M., Rupnik, M., 2015. The SOS Response Master Regulator LexA Is Associated with Sporulation, Motility and Biofilm Formation in *Clostridium difficile*. PLoS ONE 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144763>
- Walter, D., Ailion, M., Roth, J., 1997. Genetic characterization of the pdu operon: use of 1,2-propanediol in *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. 179, 1013–1022.
- Wang, C., Zhang, Q., Wang, Y., Tang, X., An, Y., Li, S., Xu, H., Li, Y., Luan, W., Wang, X., Liu, M., Yu, L., 2019. Comparative proteomics analysis between biofilm and planktonic cells of *Mycobacterium tuberculosis*. Electrophoresis 40, 2736–2746. <https://doi.org/10.1002/elps.201900030>
- Wang, P., Bouwman, F.G., Mariman, E.C.M., 2009. Generally detected proteins in comparative proteomics-a matter of cellular stress response? Proteomics 9, 2955–2966. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800826>
- Wang, S., Eisenberg, D., 2003. Crystal structures of a pantothenate synthetase from *Mycobacterium tuberculosis* and its complexes with substrates and a reaction intermediate. Protein Sci. Publ. Protein Soc. 12, 1097–1108. <https://doi.org/10.1110/ps.0241803>
- Wei, J.-R., Richie, D.L., Mostafavi, M., Metzger, L.E., Rath, C.M., Sawyer, W.S., Takeoka, K.T., Dean, C.R., 2017. LpxK Is Essential for Growth of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606: Relationship to Toxic Accumulation of Lipid A Pathway Intermediates. mSphere 2. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00199-17>
- Wilensky, A., Polak, D., Hourii-Haddad, Y., Shapira, L., 2013. The role of RgpA in the pathogenicity of *Porphyromonas gingivalis* in the murine periodontitis model. J. Clin. Periodontol. 40, 924–932. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12139>
- Wilson, M., Henderson, B., 1995. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* relevant to the pathogenesis of inflammatory periodontal diseases. FEMS Microbiol. Rev. 17, 365–379. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1995.tb00220.x>

- Xiao, Y., Sha, W., Tian, Z., Chen, Y., Ji, P., Sun, Q., Wang, H., Wang, S., Fang, Y., Wen, H.-L., Zhao, H.-M., Lu, J., Xiao, H., Fan, X.-Y., Shen, H., Wang, Y., 2016. Adenylate kinase: a novel antigen for immunodiagnosis and subunit vaccine against tuberculosis. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 94, 823–834. <https://doi.org/10.1007/s00109-016-1392-5>
- Xu, M., Yamada, M., Li, M., Liu, H., Chen, S.G., Han, Y.W., 2007. FadA from *Fusobacterium nucleatum* utilizes both secreted and nonsecreted forms for functional oligomerization for attachment and invasion of host cells. *J. Biol. Chem.* 282, 25000–25009. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611567200>
- Yamano, R., Ohara, M., Nishikubo, S., Fujiwara, T., Kawamoto, T., Ueno, Y., Komatsuzawa, H., Okuda, K., Kurihara, H., Suginaka, H., Oswald, E., Tanne, K., Sugai, M., 2003. Prevalence of Cytolethal Distending Toxin Production in Periodontopathogenic Bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1391–1398. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.4.1391-1398.2003>
- Yang, N.-Y., Zhang, Q., Li, J.-L., Yang, S.-H., Shi, Q., 2014. Progression of periodontal inflammation in adolescents is associated with increased number of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis*, and *Fusobacterium nucleatum*. *Int. J. Paediatr. Dent.* 24, 226–233. <https://doi.org/10.1111/ipd.12065>
- Yoon, E.-J., Chabane, Y.N., Goussard, S., Snesrud, E., Courvalin, P., Dé, E., Grillot-Courvalin, C., 2015. Contribution of resistance-nodulation-cell division efflux systems to antibiotic resistance and biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *mBio* 6. <https://doi.org/10.1128/mBio.00309-15>
- Zegans, M.E., Wagner, J.C., Cady, K.C., Murphy, D.M., Hammond, J.H., O'Toole, G.A., 2009. Interaction between bacteriophage DMS3 and host CRISPR region inhibits group behaviors of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 191, 210–219. <https://doi.org/10.1128/JB.00797-08>
- Zhang, Y., Shi, W., Song, Y., Wang, J., 2019. Metatranscriptomic analysis of an *in vitro* biofilm model reveals strain-specific interactions among multiple bacterial species. *J. Oral Microbiol.* 11, 1599670. <https://doi.org/10.1080/20002297.2019.1599670>

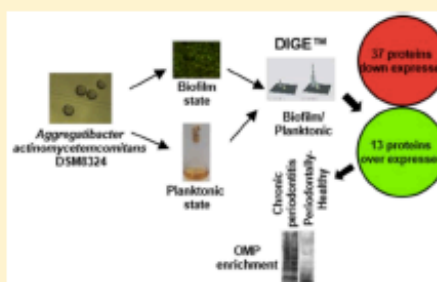
## I. Artículo 1

**Aggregatibacter actinomycetemcomitans Growth in Biofilm versus Planktonic State: Differential Expression of Proteins**Arancha Llama-Palacios,<sup>†</sup> Oksana Potupa,<sup>†</sup> María C. Sánchez,<sup>†</sup> Elena Figuero,<sup>‡</sup> David Herrera,<sup>‡</sup> and Mariano Sanz<sup>\*,‡</sup><sup>†</sup>Oral Microbiology Laboratory at the Faculty of Odontology, University Complutense, Madrid 28040, Spain<sup>‡</sup>ETEP (Etiology and Therapy of Periodontal Diseases) Research Group, University Complutense, Madrid 28040, Spain

Supporting Information

**ABSTRACT:** *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) is a pathogenic bacterium residing in the subgingival plaque biofilm strongly associated with the pathogenesis of periodontitis. The aim of this investigation was to study the protein differential expression of Aa when growing on biofilm compared with planktonic state using proteomic analysis by the 2D-DIGE system. Eighty-seven proteins were differentially expressed during biofilm growth (1.5-fold,  $p < 0.05$ ), with 13 overexpressed and 37 down-expressed. Those repressed were mainly proteins involved in metabolism, biosynthesis, and transport. The overexpressed proteins were outer membrane proteins (OMPs) and highly immunogenic proteins such as YaeT (OMP), FtsZ, OMP39, OMP18/16, the chaperone GroEL, OMPA, adenylate kinase (Adk), and dihydrolipoamide acetyltransferase. The enrichment fractions of the OMPs from biofilm and planktonic states were obtained, and these proteins were analyzed by Western blotting with human serum from a periodontitis patient and one healthy control. These immunogenic proteins overexpressed in the biofilm may represent candidate virulence factors.

**KEYWORDS:** *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, biofilm, proteomic, 2D-DIGE, outer membrane proteins

**■ INTRODUCTION**

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) is a small nonmotile Gram-negative facultative anaerobic, microaerophilic, and capnophilic coccobacillus that grows singly, in pairs, or in small clumps.<sup>1</sup> Its natural habitat is the oral cavity of humans and other mammals.<sup>2–4</sup> Within the human oral cavity, it has been isolated from a range of habitats including supragingival and subgingival plaque, saliva, cheek and buccal mucosa, gingivae, tongue (dorsal and lateral surfaces), hard palate, and tonsils.<sup>2,5</sup> Although this microorganism can be detected in the oral cavity of periodontally healthy individuals, it has been strongly associated with aggressive forms of periodontitis, mainly those affecting adolescents and young adults.<sup>6–8</sup> It has been also associated with nonoral infections such as endocarditis.<sup>9</sup>

The potential pathogenicity of this bacterium has been attributed to the presence of a variety of virulence factors that enhance its survival in the oral cavity by evading the defense host strategies. These include the ability to attach to extracellular matrix proteins<sup>10</sup> and epithelial cells;<sup>11,12</sup> its resistance to antibacterial compounds;<sup>13,14</sup> the secretion of bacteriocins;<sup>15,16</sup> the expression of proteins that inactivate host defense cells and defensive pathways, such as a leukotoxin;<sup>17</sup> a chemotactic inhibitor;<sup>18</sup> a collagenase;<sup>19</sup> a cytotoxin;<sup>20</sup> Fc-binding proteins;<sup>21</sup> immunosuppressive factors;<sup>22,23</sup> endotoxin<sup>24</sup> or surface-associated material;<sup>25,26</sup> as well as the ability to invade epithelial cells<sup>27</sup> and

tissues.<sup>28</sup> All of these pathogenic characteristics may occur in vivo when Aa colonizes and grows within the subgingival biofilm. In this state (biofilm) microorganisms may develop gene expression patterns different from those of their planktonic cells and hence may exhibit increased resistance to antimicrobial compounds, environmental stresses, and host immune defense mechanisms.<sup>29</sup>

Biofilm formation is a complex process that requires the coordinate expression and simultaneous regulation of many proteins for reversible and irreversible attachment, formation of microcolonies, and development of a stable community and 3D structure.<sup>30</sup> These sessile bacterial communities can better withstand host immune responses and antimicrobial compounds, such as antibiotics, than their nonattached individual planktonic counterparts. It is likely that biofilms evade antimicrobial challenges by multiple mechanisms,<sup>29</sup> and it is therefore important to study the protein expression by comparing bacteria in biofilms with planktonic cells. Proteins can be studied through transcriptomic analysis, although there is not always a clear correlation with their functional activity, and hence proteomic analysis is recommended.<sup>31</sup>

In this investigation, we aimed to study the differential expression of the proteins of *A. actinomycetemcomitans* DSM8324,

Received: March 6, 2017

Published: July 14, 2017



when growing in biofilms as well as in planktonic state, by using 2D difference gel electrophoresis (DIGE) and mass spectrometry identification.

## ■ EXPERIMENTAL SECTION

### Bacterial Strain and Culture Conditions

A standard reference strain of *A. actinomycetemcomitans* (DSMZ 8324) was selected and grown on blood agar plates (Blood Agar Oxoid No 2; Oxoid, Basingstoke, U.K.), supplemented with 5% (v/v) sterile horse blood (Oxoid), 5.0 mg/L hemin (Sigma, St. Louis, MO), and 1.0 mg/L menadione (Merck, Darmstadt, Germany) under anaerobic conditions (10% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, and balance N<sub>2</sub>) at 37 °C for 24–72 h, and then transferred to a protein-rich medium containing brain-heart infusion (BHI) (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ) supplemented with 2.5 g/L mucin (Oxoid), 1.0 g/L yeast extract (Oxoid), 0.1 g/L cysteine (Sigma), 2.0 g/L sodium bicarbonate (Merck), 5.0 mg/L hemin (Sigma), 1.0 mg/L menadione (Merck), and 0.25% (v/v) glutamic acid (Sigma) (modified BHI medium) until reaching an exponential growth phase.

Planktonic cell cultures were obtained by inoculating 30 mL of the modified BHI medium with bacteria suspension in a 50 mL sterile plastic tube until reaching 10<sup>7</sup> colony forming units (CFU)/mL and incubated at 37 °C during 24 h under anaerobic conditions.

Biofilms were formed on sterile plasma-coated hydroxyapatite slides (7.5 cm × 2.5 cm) (Clarkson Chromatography Products, Williamsport, PA) immersed in 100 mL of modified BHI medium with the same bacteria suspension containing 10<sup>7</sup> CFU/mL within a Petri dish of 140 mm diameter and incubated at 37 °C for 24 h under anaerobic conditions.

### Confocal Laser Scanning Microscopy

Confocal laser scanning microscope (CLSM) was used to study the structure of the *A. actinomycetemcomitans* biofilms obtained. Fully hydrated biofilms were visualized with a fixed-stage Ix83 Olympus inverted microscope coupled to an Olympus FV1200 confocal system (Olympus; Shinjuku, Tokyo, Japan) and 63× water-immersion lenses (Olympus). Specimens were stained with LIVE/DEAD BacLight™ Bacterial Viability Kit solution (Molecular Probes B. V., Leiden, The Netherlands) at room temperature. The 1:1 fluorochrome ratio and 12 ± 1 min of staining time were used to obtain the optimum fluorescence signal at the corresponding wavelengths (Syto9:515–530 nm; PI: > 600 nm).

### Protein Extraction

To extract the total proteins from biofilm growing cells, biofilms were scraped from the slide and dispersed into 1 mL of phosphate-buffered saline (PBS), where organisms were recovered by centrifugation. Cell pellets were maintained frozen until sample preparation. To extract the total proteins from planktonic cells, the bacterial culture (~30 mL) was centrifuged, and the pellet was maintained frozen until sample preparation. In both cases, biofilm and planktonic, the pellets were resuspended in PBS buffer containing 100 mM DTT (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), 0.5 mM PMSF (Sigma), 1× EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche, Mannheim, Germany), and nuclease mix (GE Healthcare). Biofilm and planktonic cells were broken using a tip sonicator Labsonic (B. Braun Biotech International, Melsungen, Germany) with 20 cycles of 10 s each (100% ultrasonic amplitude). To avoid

overheating, the samples were kept on ice during the ultrasonic process. Then, they were centrifuged to remove intact cells and residual debris.

Four pooled samples from both biofilm and planktonic state were processed for the proteomic experiments. Each pool corresponded to one biological replicate and was processed in the same manner. In brief, the proteins were precipitated with 10% (w/v) TCA (Sigma) by incubation on ice 3 h. Then, the precipitated proteins were recovered by centrifugation (9000 rpm, 10 min, 4 °C), cleaned with the wash buffer from the 2D-Clean Kit (GE Healthcare), and resuspended in a solubilization buffer consisting of 25 mM Tris (GE Healthcare), 7 M urea (GE Healthcare), 2 M thiourea (GE Healthcare), and 4% (w/v) CHAPS (GE Healthcare). The proteins were solubilized by vortexing for 3 h at room temperature and by sonication on ultrasonic bath (Branson 1510 Ultrasonic Cleaner, Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, USA), four times during 5 min. The samples were kept on ice between the time intervals. The protein concentration was determined using 2D-Quant Kit (GE Healthcare). The pH of the sample was then adjusted to pH 8.5 on ice in preparation for CyDye labeling.

### DIGE Experimental Design

Four hundred pmol of CyDye in 1 µL of anhydrous N,N-dimethylformamide (DMF) (Sigma) was used per 50 µg of protein for the labeling. After 30 min of incubation on ice in the dark, the reaction was quenched with 10 mM lysine (Sigma) and incubated for 10 min. In these experiments, the samples from biofilm and planktonic cells were labeled with Cy3 or Cy5, and to avoid any possible bias derived from the labeling efficiency, half of the samples of each condition were labeled with Cy3 dye and the other half with Cy5 dye. The Cy2 dye was used to label the internal standard sample. Samples were combined according to the experimental design described in Table 1. An equal volume of 2× sample buffer (8 M urea,

**Table 1. Experimental Design for DIGE Analysis, Indicating Gel Number, CyDye Labelling and Four Replicates for Each Condition (biofilm and planktonic) (Indicated as "1 to 4")<sup>a</sup>**

gel number	Cy2	Cy3	Cy5
1	pooled standard	biofilm 1	planktonic 4
2	pooled standard	planktonic 3	biofilm 2
3	pooled standard	biofilm 3	planktonic 1
4	pooled standard	planktonic 2	biofilm 4

<sup>a</sup>Pools of samples, both of biofilm as planktonic, were labelled with Cy3 or Cy5. An internal standard should be incorporated within each gel. The internal standard comprises pooled aliquots from all biological samples within the experiment and is labelled with Cy2.

4% (w/v) CHAPS, 130 mM DTT, 2% pharmalytes pH 3–11 NL (GE Healthcare)) was added for the cup loading.

The 2-DE was performed using GE Healthcare reagents and equipment. The first-dimension isoelectric focusing (IEF) was performed on 18 cm 3–11 NL pH range IPG strips, previously rehydrated with rehydration buffer (8 M urea, 4% (w/v) CHAPS, 13 mM DTT, 1% pharmalytes pH 3–11 NL). IEF was performed at 20 °C using the following program: 120 V for 1 h (120 Vh), 300 V for 3 h (900 Vh), 300–1000 V for 6 h (3900 Vh), 1000–8000 V for 3 h (13 500 Vh), 8000 V for 7 h 30 min (60 000 Vh), and 500 V for 12 h. After this, strips were equilibrated first for 15 min in reducing solution (6 M urea, 50 mM Tris-HCl pH 6.8, 30% v/v glycerol, 2% w/v SDS and 2% w/v DTT) and second for 15 min in alkylating solution

(6 M urea, 50 mM Tris-HCl pH 6.8, 30% v/v glycerol, 2% w/v SDS and 2.5% iodoacetamide (Sigma)). Second dimension SDS-PAGE was run on 11.5% (w/v) acrylamide gels in low fluorescence glass plates. Electrophoresis was carried out at 20 °C, 1 W/gel for 20 h, using Ettan DALTsix unit.

Preparative gels from planktonic and biofilm pool samples were prepared. For the first-dimension separation on pH 3–11 NL IPG strips, 500 µg of protein sample was focused with the following program: 120 V for 1 h (120 Vh), 300 V for 3 h (900 Vh), 300–1000 V for 6 h (3900 Vh), 1000–8000 V for 3 h (13500 Vh), 8000 V for 8 h 45 min (70000 Vh), and 500 V for 12 h.

#### Image Acquisition and DIGE Analysis

Proteins were visualized using a Typhoon 9400 scanner (GE Healthcare) with CyDye filters. For the Cy3, Cy5, and Cy2 image acquisition, the 532/580, 633/670, and 488/520 nm excitation/emission wavelengths were used, respectively, and 100 µm as pixel size. Image cropping and filtering were carried out with Image Quant v.5.1 software (GE Healthcare). Analyses for detection of different abundance between spots from different replicates were performed with the DIA (Differential In gel Analysis) module of the DeCyder 6.5 package (GE Healthcare). Matching and normalization of the internal standard spot maps using the Biological Variance Analysis (BVA) module corrected intergel variability. The internal standard image gel with the greatest number of spots was used as a master gel. BVA module was also employed for comparative cross-gel statistical analyses based on spot normalized volume ratio (Cy3: Cy2 and Cy5: Cy2).

For comparing the planktonic versus biofilm proteomic output, the average ratios and unpaired Student's *t* test were calculated. To reduce false-positives in the *p*-value calculation, the false discovery rate (FDR) was applied. Those protein spots with 1.5-fold as a threshold in the average ratio and with *p* values under 0.05 were considered as significantly differentially expressed.

#### Protein Identification

Total protein profile was detected by staining the DIGE gels with Colloidal Coomassie staining. The gel spots of interest were manually excised from the gels. Proteins selected for analysis were in-gel reduced, alkylated, and digested with trypsin according to Sechi et al.<sup>32</sup> In brief, the samples were reduced with 10 mM DTE in 25 mM ammonium bicarbonate for 30 min at 56 °C and subsequently alkylated with 55 mM iodoacetamide in 25 mM ammonium bicarbonate for 15 min in the dark. Finally, samples were digested with 12.5 ng/µL sequencing-grade trypsin (Roche) in 25 mM ammonium bicarbonate (pH 8.5) overnight at 37 °C. After digestion, the supernatant was collected and 1 µL was spotted onto a MALDI target plate and allowed to air-dry at room temperature. Then, 0.4 µL of a 3 mg/mL of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid matrix (Sigma) in 50% acetonitrile was added to the dried peptide digest spots and allowed again to air-dry at room temperature.

MALDI-TOF MS analyses were performed in a 4800 Plus Proteomics Analyzer MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Applied Biosystems, MDS Sciex, Toronto, Canada) at the Genomics and Proteomics Center, University Complutense, Madrid (Spain). The MALDI-TOF/TOF operated in positive reflector mode with an accelerating voltage of 20000 V. All mass spectra were calibrated internally using peptides from the auto digestion of trypsin.

Proteins ambiguously identified by peptide mass fingerprints were subjected to MS/MS sequencing analyses using the 4800 Plus Proteomics Analyzer. They were selected from the MS spectra suitable precursor for MS/MS analyses by CID (atmospheric gas was used) 1 kV ion reflector mode and precursor mass Windows  $\pm 4$  Da. The plate model and default calibration were optimized for the MS/MS spectra processing.

For protein identification, NCBI nr (40910947 sequences; 14 639 572 021 residues) and Actinomyces (77 445 sequences; 20 877 593 residues) with taxonomy restriction to *A. actinomycetemcomitans* were searched using MASCOT 2.3 ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)) through the Global Protein Server v 3.6 from ABSciex. Search parameters were: (i) carbamidomethyl cysteine as fixed modification and oxidized methionine as variable modification; (ii) peptide mass tolerance, 50 ppm (PMF)–80 ppm (MSMS or Combined search); (iii) 1 missed trypsin cleavage site; and (iv) MS/MS fragments tolerance, 0.3 Da.

The parameters for the combined search (peptide mass fingerprint plus MS/MS spectra) were the same as described above. In all protein identification, the probability scores were greater than the score fixed by mascot as significant with a *p* < 0.05.

#### Outer Membrane Preparation, SDS-PAGE, and Western Immunoblotting

The outer membrane proteins were prepared from *A. actinomycetemcomitans* biofilm and planktonic samples by a slightly modified version of the method of Haase et al.<sup>33</sup> In brief, cells from biofilm and planktonic samples were resuspended in 10 mM HEPES (Sigma) (pH 7.4) containing 0.5 mM PMSF (Sigma) and 1× EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche). The suspension was sonicated with tip sonicator Labsonic (B. Braun) with 20 cycles of 10 s each (100% ultrasonic amplitude). To avoid overheating the material, the samples were kept on ice during the ultrasonic process. Then, cell debris were removed by centrifugation for 10 min at 2000g at 4 °C. The total membrane pellet obtained by ultracentrifugation of the supernatant at 105 000g for 1 h (Beckman Ti50.3 rotor; Beckman Coulter, Brea, CA) at 4 °C was then suspended in 1% sodium laurylsarcosine (Sarkosyl, Sigma) in 10 mM HEPES (pH 7.4) and gently agitated for 1 h at room temperature. The outer membrane-enriched fraction was pelleted by ultracentrifugation at 105 000g for 1 h at 4 °C, then resuspended in 300 µL of distilled water, and the protein was quantified using Bradford protein assay.

Outer membrane proteins from biofilm and planktonic samples (20 µg) were denatured by heating in SDS buffer containing 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 5% (w/v) SDS, 25% (v/v) glycerol, 0.2% (w/v) bromophenol blue, and 20% (w/v) DTT for 5 min at 95 °C. Protein samples were separated by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis using the Mini-PROTEAN Tetra Cell electrophoresis system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). A prestained molecular mass standard (Precision Plus Protein, Bio-Rad) was included in each run. The SDS-PAGE bands were excised from the colloidal Coomassie blue-stained gel and in-gel digested. The MALDI-TOF identification was performed as previously described.

For the immunoblot analysis, proteins were electrotransferred onto nitrocellulose membranes of pore size 0.45 µm (Amersham Protran; GE Healthcare) at 100 mA for 1 h using 1× Transfer Buffer (38.6 mM glycine, 41.3 mM Tris, 0.04% SDS, 20% methanol). Successful transfer was controlled using the ECL DualVue Western blotting markers (GE Healthcare). Nonspecific reactivity was blocked for 1 h at room temperature



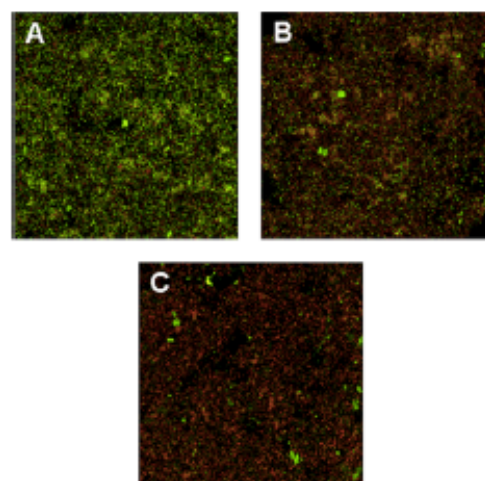
with 5% (w/v) nonfat skim milk in TTBS (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.03% (v/v) Tween 20 (AppliChem Panreac, Darmstadt, Germany)). The membranes were probed 2 h at room temperature with a serum (final dilution 1:400 in TTBS with 1% (w/v) nonfat skimmed milk) taken from a patient suffering generalized moderate chronic periodontitis, positive for *A. actinomycetemcomitans* in gingival crevicular fluid. She had the following clinical characteristics: probing pocket depths (45.5% were shallow (1–3 mm); 43.2% were intermediate (4–5 mm) and 12% ( $\geq 6$  mm)), bleeding on probing: 32.72% and plaque: 61.70%. Her microbiological profile was: *A. actinomycetemcomitans* ( $9.6 \times 10^4$  cfu/mL), *Fusobacterium nucleatum* ( $7 \times 10^3$  cfu/mL), and *Tannerella forsythia* ( $1.5 \times 10^4$  cfu/mL). As a control, a serum collected from a periodontally healthy patient, with absence of periodontal pathogens, was used (1:400). The clinical data of this healthy patient were: probing pocket depths (96.4% were shallow (1–3 mm); 3.6% were intermediate (4–5 mm) and 0% ( $\geq 6$  mm)), bleeding on probing: 13.09% and plaque: 10.71%. After washing (TTBS), as secondary antibody, antihuman IgG (Fc-specific) peroxidase conjugate (Sigma) was used (1:2000 in TTBS with 1% (w/v) nonfat skimmed milk) during 2 h at room temperature. Immunoreactive bands were visualized using a chemiluminescence detection system ECL (ECL Western blotting detection reagents, GE Healthcare) on autoradiographic medical X-ray film (GE Healthcare).

## RESULTS AND DISCUSSION

### In Vitro Biofilm Formation

Before performing the experiments, different bacterial concentrations from both biofilm and planktonic cell incubation were analyzed at different times using culture standard techniques until optimal conditions were achieved (data not shown).

Figure 1 shows a representative confocal micrograph depicting 2D projection images of the biofilm at different time points (24, 48, and 96 h). Viability of the biofilms obtained



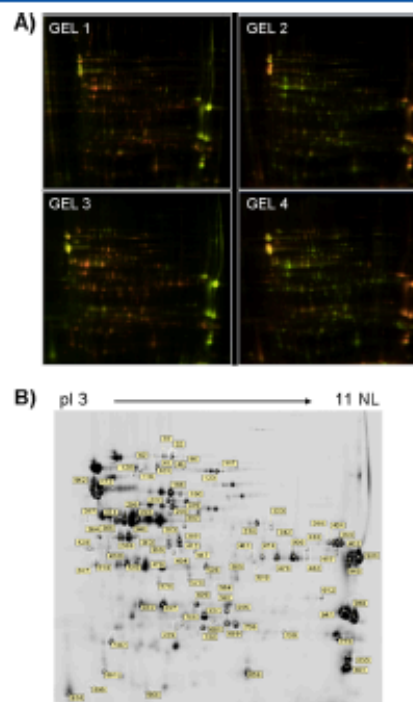
**Figure 1.** Confocal micrographs representing a 2D maximum projection of the series along a fixed axis of the biofilms after 24 (A), 48 (B), and 72 h (C) of growth. BacLight Live/Dead stain was used to assess the vitality of cells.

was analyzed using CLSM images stained with LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability kit solution, clearly identifying the viable and nonviable bacteria as green- and red-stained cells, respectively.

### Differential Protein Expression in Biofilm versus Planktonic State

Biofilms developed on coated hydroxyapatite slides provided small quantities of protein that were insufficient for the proteomic analysis. Hence, pooled samples were used, similarly to planktonic samples.

Two-dimensional electrophoresis presents several advantages over other techniques in proteomic studies such as direct visualization of the protein maps, thus allowing easy identification of protein isoforms and posttranslational modifications as well as comparison with other existing protein maps databases.<sup>34</sup> Moreover, the DIGE system has shown a high sensitivity.<sup>35,36</sup> To the best of our knowledge, this is the first investigation on the differential protein expression of *Aa* using the DIGE system. Table 1 depicts the experimental design. In these experiments two samples from a different replicate (Cy3 and Cy5) and an aliquot of the internal standard pool (Cy2) were separated by 2-DE in each of the four gels (Figure 2A).



**Figure 2.** 2D-DIGE analysis identified proteins differentially expressed in biofilm and planktonic states. (A) Cy3 and Cy5 merged images of the 2D-DIGE: the four gels corresponding with the four biological replicates. (B) 2D-DIGE scan of *A. actinomycetemcomitans* sample gel master image with the proteins of interest (proteins differentially expressed) with the corresponding number master.

Eighty-seven protein spots displaying statistically significant differences between biofilm and planktonic grown (1.5-fold ( $p < 0.05$ )) in their level of protein expression cells, which were visually confirmed not to be artifacts, were identified (Figure 2B), and a total of 79 protein spots were excised from the gel. The excised proteins were subjected to trypsin digestion and MS (MALDI-TOF/TOF) study of the corresponding peptide fragments, being able to identify 71 proteins (Table 2). The spectra obtained were found in Supporting Information Figure S1. The nonidentified proteins (8) did not have a enough amount of available protein. These 71 identified spots rendered 50 unique proteins, with several having multiple isoforms (i.e., spot 186 and spot 190), and, in some cases, the protein fractions resulted in the same proteins with the same isoelectric points but with smaller sizes (spot 612; spot 948) (Figure 2B). The numbers on the gel master in Figure 2B correspond to the numbers in Table 2, which summarizes the identified proteins with their average ratio (biofilm/planktonic),

statistical data ( $t$  test), GI accession (sequence identification), protein name, and MASCOT data (% sequence coverage and protein score). These proteins were classified according to their biological function into down-expressed or overexpressed.

#### Down-Expressed Proteins in Biofilm Growth

Most of the statistically significant differences findings occurred in *A. actinomycetemcomitans* growing in biofilms and were associated with down-regulation of protein expression. Thirty-seven proteins from a total of 50 differential proteins, were identified (Table 2). Examination of the functional categories of proteins confirmed that this downturn in protein expression represented a regulated state of lower metabolism, biosynthesis (amino acid, coenzyme, cofactor or fatty acid biosynthesis) and transport, what is consistent with the reduced metabolic activity that occurs in mature biofilms.<sup>37,38</sup> These results are consistent with other studies also analyzing differences in protein expression when bacteria are forming biofilms.<sup>39–41</sup> In the case of the proteins involved in transport, down regulations

Table 2. Proteins Differentially Expressed *A. actinomycetemcomitans* in Biofilms and Planktonic States<sup>a</sup>

master gel no.	GI accession	protein name	biofilm/planktonic		% sequence coverage	protein score
			t test	av. ratio		
Metabolism						
101	491742098	dihydrodipicolinate acetyltransferase	0.0023	1.89	24	341
117	491741753	transketolase	0.0019	-1.6	33	108
123	491741753	transketolase	0.0027	-1.52	42	182
186	491692275	phosphoenolpyruvate carboxylase	0.0012	-2.08	65	285
190	491692275	phosphoenolpyruvate carboxylase	0.0036	-1.6	22	101
222	518348158	phosphomannomutase	0.002	-1.94	44	246
229	518348158	phosphomannomutase	0.0015	-1.75	48	217
258	491734857	aspartate ammonia-lyase	0.0025	-1.66	36	472
295	491738229	enolase	0.0017	-1.93	59	175
299	491738229	enolase	0.00084	-2.07	57	150
311	491738229	enolase	0.0019	-1.77	20	64
363	491730152	phosphoglycerate kinase	0.0041	-1.82	35	82
368	491730152	phosphoglycerate kinase	0.0022	-1.51	39	74
369	491730152	phosphoglycerate kinase	0.0005	-1.8	47	101
940	491730152	phosphoglycerate kinase	0.00031	-2.56	62	224
383	491730150	fructose-bisphosphate aldolase	0.00078	-1.63	8	126
385	491730150	fructose-bisphosphate aldolase	0.00041	-2.4	60	201
412	491730150	fructose-bisphosphate aldolase	0.00022	-2.76	55	147
938	491730150	fructose-bisphosphate aldolase	0.00052	-2.16	26	77
430	491741811	PTS mannose transporter subunit IIA	0.003	2.11	39	159
474	491707379	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0.0022	-1.78	18	112
479	491707379	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0.0026	-1.69	25	302
482	491707379	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0.00099	-2.49	15	141
936	491707379	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0.00084	-2.39	75	174
722	491729956	phosphoglyceromutase	0.0014	-1.54	75	201
787	491698918	inorganic pyrophosphatase	0.001	-1.52	33	308
861	491709275	PTS glucose transporter subunit IIA	0.00022	-2.32	59	151
937	491741684	trifluorophosphate isomerase	0.001	-1.57	40	510
Metabolism of Purines						
116	491741998	3'-nucleotidase	0.0017	-1.85	47	226
Transcription						
364	491742573	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	0.0015	2	52	120
898	491714067	transcription elongation factor GreA	0.0044	-1.75	44	64
125	491729383	polyl-rRNA synthetase	0.0019	-1.92	34	107
332	491690654	tyrosyl-tRNA synthetase	0.0019	-2.35	41	103
Amino Acid Biosynthesis						
318	491689753	serine hydroxymethyltransferase	0.0002	-1.95	48	165
570	491699752	dihydrodipicolinate synthase	0.0029	-2.32	38	164
578	491691360	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2-carboxylate N-succinyltransferase	0.0005	-1.53	49	136

Table 2. continued

master gcl no.	GI accession	protein name	biofilm/planktonic			protein score
			t test	av. ratio	% sequence coverage	
Cofactors, Biosynthesis						
510	491698650	thioredoxin reductase	0.00058	-1.85	59	152
Coenzyme, Biosynthesis						
584	491690606	pyridoxamine kinase	0.00017	-3	59	130
597	491690606	pyridoxamine kinase	0.000031	-4.52	37	172
Fatty-Acid Biosynthesis						
629	491714182	enoyl-ACP reductase	0.0012	-1.7	29	75
736	491742684	3-ketoacyl-ACP reductase	0.00045	-1.62	14	192
ADP Biosynthesis						
691	491738131	adenylate kinase	0.0018	1.6	43	135
Cellular Processes, Chaperones						
172	491780231	chaperonin GroL	0.00017	2.08	50	189
942	491688234	molecular chaperone GroEL	0.00053	2.02	81	345
655	491720860	peptidyl-prolyl <i>cis-trans</i> isomerase	0.000084	-1.96	49	101
Cellular Processes, Cell Division						
297	491735878	FtsZ cell division protein	0.0034	1.53	52	135
Cellular Processes, Detoxification						
447	491688058	peptide methionine sulfoxide reductase	0.00036	-1.98	53	197
454	491692871	asparaginase	0.0014	-1.71	47	166
632	443551738	penicillidoxin like protein	0.00065	2.11	48	383
637	443551738	penicillidoxin like protein	0.0028	1.6	73	147
859	491692661	superoxide dismutase	0.002	-1.98	69	94
OMP						
41	503933512	YaeT outer membrane protein assembly complex	0.00018	3.02	23	121
46	503933512	YaeT outer membrane protein assembly complex	0.00029	2.76	42	215
398	491755504	outer membrane protein 39	0.00016	3.75	54	128
399	491755504	outer membrane protein 39	0.00018	3.98	65	215
402	491755504	outer membrane protein 39	0.00025	3.53	75	276
404	491755504	outer membrane protein 39	0.000084	4.08	61	185
612	491755504	outer membrane protein 39	0.0005	3.57	54	144
830	491761969	outer membrane protein 18/16	0.0017	4.11	75	180
851	491761969	outer membrane protein 18/16	0.000078	3.52	79	252
944	491728526	outer membrane protein A	0.000087	3.93	76	311
945	491728526	outer membrane protein A	0.00041	4.27	76	310
947	491728526	outer membrane protein A	0.000096	4.06	39	108
948	491728526	outer membrane protein A	0.000052	3.72	69	213
Transport						
342	491712350	TolB translocation protein	0.000078	2.89	41	152
428	601112850	spermidine/putrescine ABC transporter substrate-binding protein	0.000087	3.65	48	127
457	491732394	iron ABC transporter substrate-binding protein	0.0049	-1.86	37	112
514	491737575	putrescine/spermidine ABC transporter substrate-binding protein 2	0.000031	-2.11	56	268
517	491756829	putrescine/spermidine ABC transporter substrate-binding protein	0.00062	-1.76	25	62
519	491722381	iron ABC transporter substrate-binding protein	0.000052	-2.25	73	91
526	491774383	thiamin/thiamine pyrophosphate ABC transporter	0.00049	-2.14	44	117
699	491691137	amino acid ABC transporter substrate-binding protein	0.0019	-2.35	69	143
705	491691137	amino acid ABC transporter substrate-binding protein	0.0021	-2.18	69	154
709	491780558	metal ABC transporter, nickel uptake transporter family	0.000084	-2.2	45	284
729	491727698	arginine ABC transporter substrate-binding protein	0.000022	-1.91	53	121
775	429155223	toluene tolerance protein	0.00062	-1.92	52	103
908	491718896	iron transporter	0.00036	-2.32	44	98
Unknown						
461	491744613	hypothetical protein	0.0025	-1.79	23	88

<sup>a</sup>Average ratios and Student's *t* test *p* values are calculated using Decyder software v6.5.

may be due to the limited availability of nutrients within the biofilm, what has been described as particularly acute within the depths of established biofilms.<sup>38</sup> It is also concurrent with other investigations describing a decrease in the expression of a membrane protein in iron deficient conditions.<sup>42</sup>

#### Overexpressed Proteins in Biofilm Growth

Because the bacteria forming biofilms have been shown to be more virulent than when growing under planktonic conditions,<sup>29</sup> overexpressed proteins in biofilm and their possible role as virulence factors were also analyzed.



Twenty-four overexpressed proteins were identified that corresponded to 13 unique proteins (Table 2). These were mainly outer membrane proteins (OMPs), proteins having an immunogenic properties, and proteins conferring virulence.

Among the identified overexpressed proteins:

• **Dihydrodipicolinate acetyltransferase** is involved in metabolism and has been described as strongly immunogenic for *Mycobacterium mycoides* subsp. *capri*,<sup>43</sup> so much that this protein is used as a diagnostic marker for "MAKPS" syndrome caused by that bacterial species.<sup>43</sup>

• **Adenylate kinase**. This enzyme participates in ADP biosynthesis. Xiao et al. have identified the adenylate kinase (ADK, Rv0733) of *Mycobacterium tuberculosis* as an antigen that induces high cellular and antibody responses in active tuberculosis patients.<sup>44</sup> Also, others authors have associated the adenylate kinase from *Streptococcus pneumoniae* as an essential element for growth.<sup>45</sup>

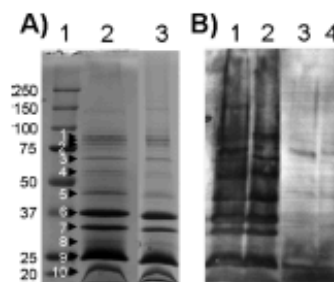
• **Chaperone GroEL**. Surface-associated material has been identified as the molecular chaperone, GroEL,<sup>46</sup> and this protein appears to act directly with bone-resorbing cells such as osteoclasts.<sup>47,48</sup> Through this mechanism, this protein has been associated with bone resorption and has been identified as a virulence factor.<sup>49,50</sup> Because a characteristic feature of periodontitis is alveolar bone resorption, the finding of this chaperone overexpressed in *A. actinomycetemcomitans* biofilms may implicate this protein as a virulence factor of this bacterial species. In fact, other studies have demonstrated that this bacterium is associated with bone resorption through different mechanisms, such as by its lipopolysaccharide,<sup>24,51</sup> proteolysis-sensitive factor in microvesicles,<sup>52</sup> and surface-associated material.<sup>53</sup>

• **Cell division protein (PtsZ)**. This essential protein PtsZ belongs to the cytoskeletal family because it forms a cytoskeletal ring at midcell, and it is involved in the division machinery that orchestrates cell division.<sup>54</sup> Several authors have highlighted the immunogenic character of this protein in *A. actinomycetemcomitans*<sup>55</sup> and in other bacteria.<sup>56</sup>

• **Peroxiredoxin-like protein**. Peroxiredoxins are low-efficiency peroxidases using thiols as reductants, and they are considered to determine virulence of mycobacteria and trypanosomatids.<sup>57</sup> Kaihama et al. have revealed the role of a 1-Cys peroxiredoxin protein as a novel virulence factor belonging to the *Pseudomonas aeruginosa* arsenal against host defenses, thus allowing this bacterium to protect from other stresses under various environmental conditions.<sup>58</sup> Similarly, other authors have also described the immunogenic role of the peroxiredoxin 2 family protein in *A. actinomycetemcomitans*.<sup>55</sup>

• **Outer membrane proteins**. The outer membrane proteins (OMPs) are surface proteins that serve essential functions for the cell, including nutrient uptake, cell adhesion, cell signaling, and waste export. For pathogenic strains, many of these OMPs also serve as virulence factors for nutrient scavenging and evasion of host defense mechanisms.<sup>59</sup> They have also been attributed to immunogenic properties.<sup>55,60–67</sup> In this investigation, we have identified the following OMPs: OMP39, OMP18/16, OMPA, and YaeT (Table 2).

With the goal of confirming the immunogenicity of these proteins extracted from *A. actinomycetemcomitans*, an enrichment of these proteins in both states (biofilm and planktonic) was extracted; different OMPs, membrane proteins, and chaperone GroEL were obtained (Figure 3A, Table 3). The spectra obtained can be found in Supporting Information Figure S2. Their immunogenic responses were tested undertaking



**Figure 3.** Outer membrane proteins (OMPs) extracted from biofilm and planktonic grown cells of *A. actinomycetemcomitans* DSM8324. (A) OMPs were separated by SDS-PAGE using 10% polyacrylamide gel, then stained with Colloidal Coomassie. Lane 1, molecular marker; Lane 2, extract from biofilm; Lane 3, extract from planktonic. The bands excised from the gel and identified by MS (MALDI-TOF/TOF) were indicated through arrows and numbers. (B) Western blotting of the different OMPs extracts using human serum from a patient with periodontitis and a patient healthy. Lane 1, extract from biofilm incubated with human serum from a patient with periodontitis; Lane 2, extract from planktonic incubated with human serum from a patient with periodontitis; Lane 3, extract from biofilm incubated with human serum from a patient healthy; Lane 4, extract from planktonic incubated with human serum from a patient healthy.

**Table 3.** Proteins Identified by Mass Spectrometry from Enrichment Fractions of the Outer Membrane Proteins (OMPs) from Biofilm and Planktonic Grown Cells<sup>a</sup>

no. band	GI accession	protein name
1	503933512	YaeT outer membrane protein assembly complex
2	502578142	LptD outer membrane protein LPS-assembly
	491729990	PgaA poly-β-1,6-N-acetyl-D-glucosamine export
3	491689683	TonB
4	491780231	GroEL molecular chaperone
5	491725647	OMPA-like
	491701008	membrane protein (TdeA)
6	491755504	OMP39
7	491725647	OMPA-like
8	491725647	OMPA-like
9	491725647	OMPA-like
10	491761969	OMP18/16

<sup>a</sup>Number of the bands is indicated in Figure 3A.

immunoblotting. For that, the same amounts of the enrichment fraction of these proteins (20 μg) were loaded in the gel, irrespective of whether *A. actinomycetemcomitans* was growing in biofilm or planktonic, and then incubated against serum from a patient with periodontitis (Figure 3B, lanes 1 and 2) and one healthy control (Figure 3B, lanes 3 and 4). It was observed that a strong immune response was elicited (in biofilm and planktonic states) with the serum from the patient with chronic periodontitis positive for *A. actinomycetemcomitans* (Figure 3B, lanes 1 and 2) when compared with the periodontally healthy subject negative for *A. actinomycetemcomitans* (Figure 3B, lanes 3 and 4). The immune response was similar under the biofilm and planktonic conditions: the protein profiles identified were analogous (Table 3), and the amount of the protein in the gel is identical (Figure 3A, lanes 2 and 3), although the measured expression of these proteins was different when assessed by DIGE (overexpressed in the biofilm).

These results were similar to results reported by other authors describing antigenic specificity to *A. actinomycetemcomitans*,<sup>53,68–73</sup> although this is one of the first investigations where extraction and immunogenicity of OMPs of this bacteria forming the biofilm are reported. Under in vivo conditions, we would expect that these proteins will be overexpressed in the oral biofilm.

## CONCLUSIONS

Seventy-eight differential proteins were identified by comparing biofilm versus planktonic growth of *A. actinomycetemcomitans*, where 13 proteins were overexpressed in biofilm growth while 37 were down expressed. The majority of the overexpressed proteins in the biofilm were outer membrane proteins and proteins that presented an immunogenic character in this bacteria and other bacteria. Further research must be done to clarify the role of these specific proteins in the virulence of *A. actinomycetemcomitans* and their potential use in both diagnosis and treatment of periodontitis.

## ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jproteome.7b00127.

Figure S1. Spectra obtained from MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (proteins differentially expressed).

Figure S2. Spectra obtained from MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (proteins extracted from OMPs enrichment). (PDF)

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*Tel: (+34) 913942021. Fax: (+34) 913941910. E-mail: marzan@ucm.es

### ORCID

Arancha Llama-Palacios: 0000-0001-6486-0120

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by CDTI (Center for the Development of Industrial Technology) of the Spanish Ministry of Science and Innovation and the company Dentaïd (Barcelona, Spain), contract number 332/2011. A.L.-P. and M.C.S. received funding from CDTI (Center for the Development of Industrial Technology) of the Spanish Ministry of Science and Innovation and the company Dentaïd (Barcelona, Spain), contract number 332/2011. O.P. received funding from the Clinical Research Foundation (CRF) for the Promotion of Oral Health, Brienzy, Switzerland. DIGE and mass spectrometry analysis were carried out in the Proteomics Facility UCM, a member of ProteoRed-ISCIII network. We acknowledge the technical assistance of Alfonso Cortés from the Centre of Microscopy and Cytometry from the University Complutense, Madrid. We thank Rubén León and Vanessa Blanc for scientific support.

## REFERENCES

- (1) Henderson, B.; Nair, S. P.; Ward, J. M.; Wilson, M. Molecular pathogenicity of the oral opportunistic pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Annu. Rev. Microbiol.* 2003, 57, 29–55.
- (2) Asikainen, S.; Alaluusua, S.; Saxen, L. Recovery of *A. actinomycetemcomitans* from teeth, tongue, and saliva. *J. Periodontol.* 1991, 62 (3), 203–206.
- (3) Asikainen, S.; Chen, C. Oral ecology and person-to-person transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol* 2000 1999, 20, 65–81.
- (4) Beem, J. E.; Harley, C. G.; Magnusson, I.; McArthur, W. P.; Clark, W. B. Subgingival microbiota in squirrel monkeys with naturally occurring periodontal diseases. *Infect Immun.* 1991, 59 (11), 4034–4041.
- (5) Müller, H. P.; Heinecke, A.; Fuhrmann, A.; Eger, T.; Zoller, L. Intraoral distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in young adults with minimal periodontal disease. *J. Periodontol. Res.* 2001, 36 (2), 114–123.
- (6) Haubek, D.; Ennibi, O. K.; Poulsen, K.; Vaeth, M.; Poulsen, S.; Kilian, M. Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* in Morocco: a prospective longitudinal cohort study. *Lancet* 2008, 371 (9608), 237–242.
- (7) Henderson, B.; Ward, J. M.; Ready, D. *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*: a triple A\* periodontopathogen? *Periodontol* 2000 2010, 54 (1), 78–105.
- (8) Holta, P.; Alaluusua, S.; Saarela, M.; Asikainen, S. Isolation frequency and serotype distribution of mutans streptococci and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, and clinical periodontal status in Finnish and Vietnamese children. *Eur. J. Oral Sci.* 1994, 102 (2), 113–119.
- (9) van Winkelhoff, A. J.; Slots, J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in nonoral infections. *Periodontol* 2000 1999, 20, 122–135.
- (10) Mintz, K. P.; Fives-Taylor, P. M. Binding of the periodontal pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to extracellular matrix proteins. *Oral Microbiol. Immunol.* 1999, 14 (2), 109–116.
- (11) Meyer, D. H.; Fives-Taylor, P. M. Characteristics of adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to epithelial cells. *Infect. Immun.* 1994, 62 (3), 928–935.
- (12) Mintz, K. P.; Fives-Taylor, P. M. Adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to a human oral cell line. *Infect. Immun.* 1994, 62 (9), 3672–3678.
- (13) Rams, T. E.; Degener, J. E.; van Winkelhoff, A. J. Antibiotic resistance in human chronic periodontitis microbiota. *J. Periodontol.* 2014, 85 (1), 160–169.
- (14) Shanmugam, M.; El Abbar, F.; Ramasubba, N. Transcriptome profiling of wild-type and pga-knockout mutant strains reveal the role of exopolysaccharide in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *PLoS One* 2015, 10 (7), e0134285.
- (15) Hammond, B. F.; Lillard, S. E.; Stevens, R. H. A bacteriocin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Arch. Oral Biol.* 1987, 32 (3), 686–691.
- (16) Lima, F. L.; de Carvalho, M. A.; Apolinio, A. C.; Benquerer, M. P.; Santoro, M. M.; Oliveira, J. S.; Alviano, C. S.; de Macedo Farias, L. *Actinomycetemcomitins*: a new bacteriocin produced by *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2008, 35 (2), 103–110.
- (17) Aberg, C. H.; Kell, P.; Johansson, A. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: virulence of its leukotoxin and association with aggressive periodontitis. *Virulence* 2015, 6 (3), 188–195.
- (18) Ashkenazi, M.; White, R. R.; Denison, D. K. Neutrophil modulation by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. I. Chemotaxis, surface receptor expression and F-actin polymerization. *J. Periodontol. Res.* 1992, 27 (4), 264–273.
- (19) Suomalainen, K.; Sorsa, T.; Saxen, L.; Vanhkonen, M.; Uitto, V. J. Collagenase activity in gingival crevicular fluid of patients with juvenile periodontitis. *Oral Microbiol. Immunol.* 1991, 6 (1), 24–29.



- (20) Helgeland, K.; Nordby, O. Cell cycle-specific growth inhibitory effect on human gingival fibroblasts of a toxin isolated from the culture medium of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Periodontol. Res.* 1993, 28 (3), 161–165.
- (21) Tolo, K.; Helgeland, K. Fe-binding components: a virulence factor in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*? *Oral Microbiol. Immunol.* 1991, 6 (6), 373–377.
- (22) Kurita-Ochiai, T.; Ochiai, K. Immunosuppressive factor from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* down regulates cytokine production. *Infect. Immun.* 1996, 64 (1), 50–54.
- (23) Shenker, B. J.; Vitale, L. A.; Welham, D. A. Immune suppression induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: effects on immunoglobulin production by human B cells. *Infect. Immun.* 1990, 58 (12), 3856–3862.
- (24) Kiley, P.; Holt, S. C. Characterization of the lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 and NZ7. *Infect. Immun.* 1980, 30 (3), 862–873.
- (25) Meghji, S.; Henderson, B.; Nair, S.; Wilson, M. Inhibition of bone DNA and collagen production by surface-associated material from bacteria implicated in the pathology of periodontal disease. *J. Periodontol.* 1992, 63 (9), 736–742.
- (26) Wilson, M.; Kamin, S.; Harvey, W. Bone resorbing activity of purified capsular material from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Periodontol. Res.* 1985, 20 (5), 484–491.
- (27) Meyer, D. H.; Sreenivasan, P. K.; Fives-Taylor, P. M. Evidence for invasion of a human oral cell line by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect. Immun.* 1991, 59 (8), 2719–2726.
- (28) Raja, M.; Ummer, F.; Dhivakar, C. P. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* - a tooth killer? *J. Clin. Diagn. Res.* 2014, 8 (8), ZEI3–16.
- (29) Costerton, J. W.; Stewart, P. S.; Greenberg, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999, 284 (5418), 1318–1322.
- (30) Kubonisa, M.; Tribble, G. D.; Hendrickson, E. L.; Amano, A.; Lamont, R. J.; Hackett, M. Insights into the virulence of oral biofilms: discoveries from proteomics. *Expert Rev. Proteomics* 2012, 9 (3), 311–323.
- (31) Keller, M.; Hettich, R. Environmental proteomics: a paradigm shift in characterizing microbial activities at the molecular level. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2009, 73 (1), 62–70.
- (32) Sechi, S.; Chait, B. T. Modification of cysteine residues by alkylation. A tool in peptide mapping and protein identification. *Anal. Chem.* 1998, 70 (24), 5150–5158.
- (33) Haase, E. M.; Zmuda, J. L.; Scannapieco, F. A. Identification and molecular analysis of rough-colony-specific outer membrane proteins of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect. Immun.* 1999, 67 (6), 2901–2908.
- (34) Gorg, A.; Weiss, W.; Dunn, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 2004, 4 (12), 3665–3685.
- (35) Tonge, R.; Shaw, J.; Middleton, B.; Rowlinson, R.; Rayner, S.; Young, J.; Pogran, F.; Hawkins, E.; Currie, I.; Davison, M. Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics* 2001, 1 (3), 377–396.
- (36) Van den Bergh, G.; Arckens, L. Fluorescent two-dimensional difference gel electrophoresis unveils the potential of gel-based proteomics. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2004, 15 (1), 38–43.
- (37) Rathnam, C.; Eaton, R. E.; Simpson, C. L.; Browne, G. V.; Berg, T.; Hart, D. W.; Jacques, N. A. Up-regulation of competence- but not stress-responsive proteins accompanies an altered metabolic phenotype in *Streptococcus mutans* biofilms. *Microbiology* 2005, 151 (6), 1823–1837.
- (38) Donlan, R. M.; Costerton, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002, 15 (2), 167–193.
- (39) Rathnam, C.; Eaton, R. E.; Simpson, C. L.; Browne, G. V.; Valova, V. A.; Hart, D. W.; Jacques, N. A. Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis analysis of *Streptococcus mutans* biofilms. *J. Proteome Res.* 2005, 4 (6), 2161–2173.
- (40) Gilley, R. P.; Orihuela, C. J. Pneumococci in biofilms are non-invasive: implications on nasopharyngeal colonization. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2014, 4, 163.
- (41) Pham, T. K.; Roy, S.; Noirel, J.; Douglas, I.; Wright, P. C.; Stafford, G. P. A quantitative proteomic analysis of biofilm adaptation by the periodontal pathogen *Tannerella forsythia*. *Proteomics* 2010, 10 (17), 3130–3141.
- (42) Winston, J. L.; Chen, C. K.; Neiders, M. E.; Dyer, D. W. Membrane protein expression by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in response to iron availability. *J. Dent. Res.* 1993, 72 (10), 1366–1373.
- (43) Corona, L.; Cillara, G.; Tola, S. Proteomic approach for identification of immunogenic proteins of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. *Vet. Microbiol.* 2013, 167 (3–4), 434–439.
- (44) Xiao, Y.; Sha, W.; Tian, Z.; Chen, Y.; Ji, P.; Sun, Q.; Wang, H.; Wang, S.; Fang, Y.; Wen, H. L.; Zhao, H. M.; Lu, J.; Xiao, H.; Fan, X. Y.; Shen, H.; Wang, Y. Adenylate kinase: a novel antigen for immunodiagnosis and subunit vaccine against tuberculosis. *J. Mol. Med. (Heidelberg, Ger.)* 2016, 94 (7), 823–834.
- (45) Thach, T. T.; Luong, T. T.; Lee, S.; Rhee, D. K. Adenylate kinase from *Streptococcus pneumoniae* is essential for growth through its catalytic activity. *FEBS Open Bio* 2014, 4, 672–682.
- (46) Kirby, A. C.; Meghji, S.; Nair, S. P.; White, P.; Reddi, K.; Nishihara, T.; Nakashima, K.; Willis, A. C.; Sim, R.; Wilson, M.; et al. The potent bone-resorbing mediator of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is homologous to the molecular chaperone GroEL. *J. Clin. Invest.* 1995, 96 (3), 1185–1194.
- (47) Wilson, M.; Henderson, B. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* relevant to the pathogenesis of inflammatory periodontal diseases. *FEMS Microbiol. Rev.* 1995, 17 (4), 365–379.
- (48) Meghji, S.; Wilson, M.; Barber, P.; Henderson, B. Bone resorbing activity of surface-associated material from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Flavobacterium corrodens*. *J. Med. Microbiol.* 1994, 41 (3), 197–203.
- (49) Kieselbach, T.; Zijng, V.; Granstrom, E.; Oscarsson, J. Proteomics of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* outer membrane vesicles. *PLoS One* 2015, 10 (9), e0138591.
- (50) Zijng, V.; Kieselbach, T.; Oscarsson, J. Proteomics of protein secretion by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *PLoS One* 2012, 7 (7), e41662.
- (51) Tan, Y.; Tan, M.; Yamada, T.; Kato, I. Extracellular antigens of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 in severe alveolar bone loss patients studied by two-dimensional electrophoresis and western blots. *Microbiol. Immunol.* 1995, 39 (4), 261–268.
- (52) Nowotny, A.; Behling, U. H.; Hammond, B.; Lai, C. H.; Listgarten, M.; Pham, P. H.; Sanavi, F. Release of toxic microvesicles by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect. Immun.* 1982, 37 (1), 151–154.
- (53) Meghji, S.; Henderson, B.; Kirby, A.; Newman, H. N.; Wilson, M. Serum antibody response to surface-associated material from periodontopathogenic bacteria. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1995, 10 (2), 101–108.
- (54) Hurley, K. A.; Santos, T. M.; Nepomaceno, G. M.; Huynh, V.; Shaw, J. T.; Weibel, D. B. Targeting the bacterial division protein PtsZ. *J. Med. Chem.* 2016, 59 (15), 6975–6998.
- (55) Rylev, M.; Abdaljabar, A. B.; Reinholdt, J.; Ennibi, O. K.; Haubek, D.; Birkeland, S.; Kilian, M. Proteomic and immunoproteomic analysis of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* JP2 clone strain HK1651. *J. Proteomics* 2011, 74 (12), 2972–2985.
- (56) Nowalk, A. J.; Gilmore, R. D., Jr.; Carroll, J. A. Serologic proteome analysis of *Borrelia burgdorferi* membrane-associated proteins. *Infect. Immun.* 2006, 74 (7), 3864–3873.
- (57) Hofmann, B.; Hecht, H. J.; Flohe, L. Peroxiredoxins. *Biol. Chem.* 2002, 383 (3–4), 347–364.
- (58) Kallham, G. H.; Almeida, J. R.; Santos, S. S.; Netto, L. E.; Almeida, S. R.; Baldini, R. L. Involvement of a 1-Cys peroxiredoxin in bacterial virulence. *PLoS Pathog.* 2014, 10 (10), e1004442.



- (59) Rollauer, S. E.; Soreshtiani, M. A.; Noinaj, N.; Buchanan, S. K. Outer membrane protein biogenesis in Gram-negative bacteria. *Philos. Trans. R. Soc. B* 2015, 370 (1679), 20150023.
- (60) Komatsu, H.; Asakawa, R.; Kawai, T.; Ochiai, K.; Fujiwara, T.; Taubman, M. A.; Ohara, M.; Kurihara, H.; Sugai, M. Identification of six major outer membrane proteins from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Gene* 2002, 288 (1–2), 195–201.
- (61) Wilson, M. E. The heat-modifiable outer membrane protein of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: relationship to OmpA proteins. *Infect. Immun.* 1991, 59 (7), 2505–2507.
- (62) Veith, P. D.; O'Brien-Simpson, N. M.; Tan, Y.; Djatmiko, D. C.; Dashper, S. G.; Reynolds, E. C. Outer membrane proteome and antigens of *Tannerella forsythia*. *J. Proteome Res.* 2009, 8 (9), 4279–4292.
- (63) Veith, P. D.; Dashper, S. G.; O'Brien-Simpson, N. M.; Paolini, R. A.; Orth, R.; Walsh, K. A.; Reynolds, E. C. Major proteins and antigens of *Treponema denticola*. *Biochim. Biophys. Acta, Protein Proteomics* 2009, 1794 (10), 1421–1432.
- (64) Barenkamp, S. J.; Munson, R. S., Jr.; Grano, D. M. Subtyping isolates of *Haemophilus influenzae* type b by outer-membrane protein profiles. *J. Infect. Dis.* 1981, 143 (5), 668–676.
- (65) Müller, D.; Poolman, J. T.; Bernadina, W. E.; van Koll, P. J.; Ruitenberg, E. J. Characterization of outer membrane proteins from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Microb. Pathog.* 1990, 9 (4), 227–233.
- (66) White, P. A.; Nair, S. P.; Kim, M. J.; Wilson, M.; Henderson, B. Molecular characterization of an outer membrane protein of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* belonging to the OmpA family. *Infect. Immun.* 1998, 66 (1), 369–372.
- (67) Paul-Satyaseela, M.; Karched, M.; Bian, Z.; Thal, R.; Boren, T.; Aronqvist, A.; Chen, C.; Asikainen, S. Immunoproteomics of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* outer-membrane proteins reveal a highly immunoreactive peptidoglycan-associated lipoprotein. *J. Med. Microbiol.* 2006, 55 (7), 931–942.
- (68) Ebersole, J. L.; Cappelli, D.; Sandoval, M. N.; Steffen, M. J. Antigen specificity of serum antibody in *A. actinomycetemcomitans*-infected periodontitis patients. *J. Dent. Res.* 1995, 74 (2), 658–666.
- (69) Ebersole, J. L.; Cappelli, D.; Steffen, M. J. Longitudinal dynamics of infection and serum antibody in *A. actinomycetemcomitans* periodontitis. *Oral Dis.* 1995, 1 (3), 129–138.
- (70) Ebersole, J. L.; Hall, E. E.; Steffen, M. J. Antigenic diversity in the periodontopathogen. *Immunol. Invest.* 1996, 25 (3), 203–214.
- (71) Ebersole, J. L.; Steffen, M. J.; Cappelli, D. Longitudinal human serum antibody responses to outer membrane antigens of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Clin. Periodontol.* 1999, 26 (11), 732–741.
- (72) Ebersole, J. L.; Cappelli, D.; Steffen, M. J. Antigenic specificity of gingival crevicular fluid antibody to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Dent. Res.* 2000, 79 (6), 1362–1370.
- (73) Bolstad, A. I.; Kristoffersen, T.; Olsen, I.; Preus, H. R.; Jensen, H. B.; Vastand, E. N.; Bakken, V. Outer membrane proteins of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus* studied by SDS-PAGE and immunoblotting. *Oral Microbiol. Immunol.* 1990, 5 (3), 155–161.

## II. Artículo 2

Received: 15 February 2020 | Revised: 1 June 2020 | Accepted: 11 June 2020

DOI: 10.1111/omi.12303

### ORIGINAL ARTICLE



# Proteomic analysis of *Fusobacterium nucleatum* growth in biofilm versus planktonic state

Arancha Llama-Palacios<sup>1,2</sup> | Oksana Potupa<sup>1</sup> | María C. Sánchez<sup>1,2</sup> | Elena Figuero<sup>2</sup> | David Herrera<sup>2</sup> | Mariano Sanz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Oral Microbiology Laboratory at the Faculty of Odontology, University Complutense, Madrid, Spain

<sup>2</sup>Etiology and Therapy of Periodontal Diseases Research Group, University Complutense, Madrid, Spain

#### Correspondence

Mariano Sanz, ETEP (Etiology and Therapy of Periodontal Diseases) Research Group, University Complutense, Madrid, Spain. Email: marsan@ucm.es

#### Funding information

Extraordinary Chair DENTAID in Periodontal Research (University Complutense of Madrid, Spain); Clinical Research Foundation (CRF) for the Promotion of Oral Health (Brienz, Switzerland)

### Abstract

*Fusobacterium nucleatum* is isolated from both supra- and sub-gingival dental biofilms in humans and has been implicated in the aetiology of periodontitis. Also, this bacterium plays an important role in serious infections in other parts of the body. The aim of this investigation was to study the protein differential expression of *F. nucleatum* when growing on biofilm, compared to planktonic state, using proteomic analysis by the 2D-DIGE™ system. In all, 68 proteins were differentially expressed during biofilm growth (1.5-fold,  $p < .05$ ), being 20 downexpressed and 31 overexpressed. The repressed proteins belonged to metabolism, biosynthesis and were outer membrane proteins (OMPs); and overexpressed were proteins involved in metabolism, transcription, translation, transport and proteins with unknown function. Also, of the seven enzymes that regulate the synthesis of butyrate, six of them were differentially expressed (overexpressed and downexpressed) when the bacteria were forming biofilms. The enzymatic activities of two of the enzymes in the butyrate pathway were analysed when the bacteria were growing in biofilms or in planktonic growth. All these results confirmed that this metabolic pathway is important in the formation of the biofilm of *F. nucleatum* and in its pathogenicity, both in the oral cavity and in other locations of the body.

### KEYWORDS

2D-DIGE™, biofilm, butyrate pathway, *Fusobacterium nucleatum*, proteomic

## 1 | INTRODUCTION

*Fusobacterium nucleatum* is a non-motile, non-spore forming, fusiform, or spindle-shaped gram-negative anaerobic rod from the Bacteroidaceae family and the phylum *Fusobacteriia* (Bolstad, Jensen, & Bakken, 1996). Its main ecological niche is within the oral cavity and due to its intrinsic ability to form aggregates with other bacteria, it is one of the key components of dental plaque biofilms, which, if allowed to grow and mature, are the main responsible for the dysbiotic changes leading to periodontitis (Signat, Roques, Poulet,

& Duffaut, 2011). Furthermore, *F. nucleatum* has been isolated in bacteraemia and infectious diseases in other parts of the body (Bennett & Eley, 1993), including head and neck, gut, respiratory tract, brain, liver, pancreas or lungs, pericarditis and aspiration pneumonia (Athavale, Leitch, & Cowling, 2002; Brook & Walker, 1986; Kostic, Xavier, & Gevers, 2014). Moreover, *F. nucleatum* has been linked with the pathogenesis of oral cavity, and with the colorectal and pancreatic cancers (Castellari et al., 2012; Gholizadeh, Eslami, & Kafil, 2017; Kostic et al., 2013; McCoy et al., 2013; Mitsuhashi et al., 2015; Shang & Liu, 2018).

© 2020 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd

168 | wileyonlinelibrary.com/journal/omi

Mol Oral Microbiol. 2020;35:168–180.

The ability of *F. nucleatum* to co-aggregate with other bacteria has been linked to its form as a long rod, behaving as a structural bacteria bridging early and late colonizers to the tooth surface, when forming dental plaque biofilms (Kolenbrander & London, 1993). Furthermore, its high ability to reduce oxygen levels promotes the overgrowth of less aerotolerant and more pathogenic organisms like *Porphyromonas gingivalis* (Bradshaw & Marsh, 1998). This structural role of *F. nucleatum* within dental biofilms also provides physical protection to other more fragile bacteria when exposed to adverse environmental conditions. In general, bacteria growing in biofilms exhibit altered phenotypes and are more resistant to antimicrobial agents and defensive host immune responses (Hall-Stoodley, Costerton, & Stoodley, 2004). The characterization of biofilms has revealed that cells within them exhibit different concentrations of proteins involved in metabolism, transport and regulation (Resch et al., 2006; Sauer, 2003). Our research group has recently demonstrated that *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, a key pathogenic bacterial species in the aetiology of periodontitis, demonstrated a significant differential expression of proteins when growing in biofilm, with repression of proteins involved in metabolism, biosynthesis and transport and overexpression of outer membrane (OMPs) and highly immunogenic proteins (Llama-Palacios et al., 2017).

It has been postulated that decreased growth rates and an altered metabolism might be reasons for the higher tolerance of cells in a biofilm toward therapeutic agents (Resch et al., 2006). The proteomic study of these pathogens, when growing in biofilm state versus planktonic, offers an opportunity to better understanding the behaviour of oral microorganisms when adapting to the environmental conditions present in the oral cavity and forming biofilms attached to tooth and artificial surfaces (Gupta, Govila, & Saini, 2015).

The present study uses a proteomic approach using the two-dimensional (2D) gel electrophoresis (DIGE™) system together with mass spectrometry to assess the changes in protein expression of *F. nucleatum* DSM 20,482 when growing in biofilm versus planktonic states.

## 2 | METHODS

### 2.1 | Bacterial strain and culture conditions

A standard reference strain of *F. nucleatum* (DSM 20,482) was selected and grown on blood agar plates (Blood Agar Oxoid No 2; Oxoid), supplemented with 5% (v/v) sterile horse blood (Oxoid), 5.0 mg/L hemin (Sigma) and 1.0 mg/L menadione (Merck) under anaerobic conditions (10% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> and balance N<sub>2</sub>) at 37°C for 24–72 hr. Then, it was transferred to a protein-rich medium containing brain-heart infusion (BHI) (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) supplemented with 2.5 g/L mucin (Oxoid), 1.0 g/L yeast extract (Oxoid), 0.1 g/L cysteine (Sigma), 2.0 g/L sodium bicarbonate (Merck), 5.0 mg/L hemin (Sigma), 1.0 mg/L menadione (Merck) and 0.25% (v/v) glutamic acid (Sigma) (modified BHI medium), until reaching an exponential growth phase.

Planktonic cell cultures were obtained by inoculating 30 ml of the modified BHI medium with bacterial suspension in a 50-ml sterile plastic tube until reaching 10<sup>7</sup> colony forming units (CFU)/mL and incubated at 37°C during 24 hr in anaerobic conditions.

Biofilms were formed on sterile plasma-coated hydroxyapatite slides (7.5 cm × 2.5 cm) (Clarkson Chromatography Products) immersed in 100 ml modified BHI medium with the same bacterial suspension containing 10<sup>7</sup> CFU/ml within a Petri dish of 140 mm diameter and incubated at 37°C during 24 hr in anaerobic conditions.

### 2.2 | Protein extraction

These mono-species bacteria biofilms were scraped from the slide, dispersed into 1 ml phosphate-buffered saline (PBS) and organisms were recovered by centrifugation and maintained frozen as cell pellets until sample preparation for proteomic analysis. In the case of planktonic cells, the bacterial culture (about 30 ml) was centrifuged, and the pellet was maintained frozen until sample preparation. Both pellets, biofilm and planktonic, were re-suspended in PBS buffer containing 100 mM DTT (GE Healthcare), 0.5 mM PMSF (Sigma), 1× EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche) and nuclease mix (GE Healthcare), and the cells were broken using a tip sonicator (Branson Sonifier™ ultrasonic cell disrupter, Branson Ultrasonics Corporation) with discontinuous pulses of 20 ms for 3 s. To avoid overheating, the samples were kept on ice during the ultrasonic process. Then, they were centrifuged to remove intact cells and residual debris.

Three pooled samples from biofilm and three pooled samples from planktonic states were processed for the proteomic experiments. Each pool corresponded to one biological replicate and was processed in the same manner. In brief, the proteins were precipitated with 10% (w/v) TCA (Sigma) by incubation on ice 3 hr. Then, the precipitated proteins were recovered by centrifugation (7,500 g, 10 min, 40°C), cleaned with the wash buffer from the 2D-Clean Kit™ (GE Healthcare), and re-suspended in a solubilization buffer consisting of 25 mM Tris (GE Healthcare), 7 M urea (GE Healthcare), 2 M thiourea (GE Healthcare) and 4% (w/v) CHAPS (GE Healthcare). The proteins were solubilized by vortexing during 3 hr at room temperature and by sonication on an ultrasonic bath (Branson 1510 Ultrasonic Cleaner; Branson), four times for 5 min. The samples were kept on ice between during these time intervals and their protein concentration was determined using 2D-Quant Kit™ (GE Healthcare). The pH of the sample was then adjusted to pH 8.5 in preparation for CyDye labelling.

### 2.3 | DIGE experimental design

Four hundred pmol of CyDye in 1 µl of anhydrous N,N-Dimethylformamide (DMF) (Sigma) was used per 50 µg of protein for the labelling. After 30 min of incubation on ice in the dark, the reaction was quenched with 10 mM lysine (Sigma) and incubated for 10 min. In these experiments, the samples from biofilm and

planktonic cells were labelled with Cy3 or Cy5 and to avoid any possible bias derived from the labelling efficiency, half of the samples of each condition were labelled with Cy3 dye and the other half with Cy5 dye. The Cy2 dye was used to label the internal standard sample. Samples were combined according to the experimental design. An equal volume of 2× sample buffer [8 M urea, 4% (w/v) CHAPS, 130 mM DTT, 2% pharmalytes pH 3–11 NL (GE Healthcare)] was added for the cup loading.

The 2-DE was performed using GE Healthcare reagents and equipment. The first-dimension isoelectric focussing (IEF) was performed on 18 cm 3–11 NL pH range IPG strips, previously rehydrated with rehydration buffer (8 M urea, 4% (w/v) CHAPS, 13 mM DTT, 1% pharmalytes pH 3–11 NL. IEF was performed at 20°C using the following programme: 120 V for 1 hr (120 Vhr), 300 V for 3 hr (900 Vhr), 300–1,000 V for 6 hr (3,900 Vhr), 1,000–8,000 V for 3 hr (13,500 Vhr), 8,000 V for 7 hr 30 min (60,000 Vhr) and 500 V for 12 hr. After this, strips were equilibrated first for 15 min in reducing solution (6 M urea, 50 mM Tris-HCl pH 6.8, 30% v/v glycerol, 2% w/v SDS and 2% w/v DTT) and second for 15 min in alkylating solution (6 M urea, 50 mM Tris-HCl pH 6.8, 30% v/v glycerol, 2% w/v SDS and 2.5% iodoacetamide [Sigma]). Second dimension SDS-PAGE was run on 11.5% (w/v) acrylamide gels in low fluorescent glass plates. Electrophoresis was carried out at 20°C, 1 W/gel for 20 hr, using Ettan™ DALTsix unit.

Preparative gels from planktonic and biofilm pool samples were prepared. For the first-dimension separation on pH 3–11 NL IPG strips, 500 µg of protein sample was focused with the following programme: 120 V for 1 hr (120 Vhr), 300 V for 3 hr (900 Vhr), 300–1,000 V for 6 hr (3,900 Vhr), 1,000–8,000 V for 3 hr (13,500 Vhr), 8,000 V for 8 hr 45 min (70,000 Vhr) and 500 V for 12 hr.

## 2.4 | Image acquisition and DIGE analysis

Proteins were visualized using a Typhoon 9400™ scanner (GE Healthcare) with CyDye filters. For the Cy3, Cy5 and Cy2 image acquisition, the 532 nm/580 nm, 633 nm/670 nm and 488 nm/520 nm excitation/emission wavelengths were used, respectively, and 100 µm as pixel size. Image cropping and filtering were carried out with Image Quant v.5.1 software (GE Healthcare). Analyses for detection of different abundance between spots from different replicates were performed with the DIA (Differential In gel Analysis) module of the DeCyder 6.5 package (GE Healthcare). Matching and normalization of the internal standard spot maps using the Biological Variance Analysis (BVA) module corrected inter-gel variability. The internal standard image gel with the greatest number of spots was used as a master gel. BVA module was also employed for comparative cross-gel statistical analyses, based on spot normalized volume ratio (Cy3: Cy2 and Cy5: Cy2).

For comparing the planktonic versus biofilm proteomic output, the average ratios and unpaired Student's *t*-test were calculated. To reduce false positives in the *p*-value calculation, the false discovery rate (FDR) was applied. Those protein spots with 1.5-fold as a

threshold in the average ratio and with *p* values under .05 were considered as significantly differentially expressed.

## 2.5 | Protein identification

Total protein profile was detected by staining the DIGE gels with Colloidal Coomassie staining. The gel spots of interest were manually excised from the gels. Proteins selected for analysis were in-gel reduced, alkylated and digested with trypsin according to Sechi & Chait (1998). Briefly, the samples were reduced with 10 mM DTE in 25 mM ammonium bicarbonate for 30 min at 56°C and subsequently alkylated with 55 mM iodoacetamide in 25 mM ammonium bicarbonate for 15 min in the dark. Finally, samples were digested with 12.5 ng/µl sequencing-grade trypsin (Roche) in 25 mM ammonium bicarbonate (pH 8.5) overnight at 37°C. After digestion, the supernatant was collected and 1 µl was spotted onto a MALDI target plate and allowed to air-dry at room temperature. Then, 0.4 µl of a 3 mg/ml of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix (Sigma) in 50% acetonitrile was added to the dried peptide digest spots and allowed again to air-dry at room temperature.

MALDI-TOF MS analyses were performed in a 4800 Plus Proteomics Analyzer MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Applied Biosystems, MDS Sciex) at the Genomics and Proteomics Center, University Complutense, Madrid (Spain). The MALDI-TOF/TOF operated in positive reflector mode with an accelerating voltage of 20,000 V. All mass spectra were calibrated internally using peptides from the auto digestion of trypsin.

Proteins ambiguously identified by peptide mass fingerprints were subjected to MS/MS sequencing analyses using the 4800 plus Proteomics Analyzer. They were selected from the MS spectra suitable precursor for MS/MS analyses by CID (atmospheric gas was used) 1 Kv ion reflector mode and precursor mass Windows  $\pm$  4 Da. The plate model and default calibration were optimized for the MS-MS spectra processing.

For protein identification, NCBI nr (17919084 sequences; 6150218869 residues) with taxonomy restriction to Bacteria (Eubacteria) (10721018 sequences) were searched using MASCOT 2.3 (www.matrixscience.com) through the Global Protein Server v 3.6 from ABSciex. Search parameters were as follows: (a) carbamidomethyl cysteine as fixed modification and oxidized methionine as variable modification; (b) peptide mass tolerance, 50 ppm (PMF)–80 ppm (MSMS or Combined search); (c) 1 missed trypsin cleavage site; and (d) MS-MS fragments tolerance, 0.3 Da.

The parameters for the combined search (Peptide mass fingerprint plus MS-MS spectra) were the same described above. In all protein identification, the probability scores were greater than the score fixed by mascot as significant with a *p* < .05.

## 2.6 | Enzyme assays

All enzyme measurements were carried out in 1-cm-path-length quartz cuvettes at room temperature using a final volume of 1 mL.



### 2.6.1 | Thiolase (acetyl-CoA acetyltransferase)

In both cases, biofilm and planktonic, the pellets were re-suspended in 100 mM Tris-HCl pH 8.0 buffer containing 0.5 mM PMSF (Sigma) and 1× EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche). Biofilm and planktonic cells were broken using a tip sonicator as it has been described above. In order to obtain enough amount of protein, the supernatants were concentrated using an Amicon® Ultra-15 10K (cutoff filter 10 kDa; Merck Millipore Ltd.) and the protein concentration was determined using the Bradford assay (Bio-Rad Laboratories). This protein extract was used for the thiolase activity. This was determined in the thiolytic direction with acetoacetyl-CoA as substrate by monitoring the decrease in absorbance at 303 nm (Stern, 1956). The activity was assayed by a slightly modified version of the method of Hartmanis et al. (Hartmanis & Gatenbeck, 1984). This activity was measured every minute for 1 hr in each experiment. The assay mixture contained the following: 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM DTT, 10 mM MgCl<sub>2</sub> and 500 µg protein extract from biofilm or planktonic. The addition of 100 µM acetoacetyl-CoA (MP Biomedicals) and 400 µM coenzyme A (MP Biomedicals) initiated the reaction. The disappearance of acetoacetyl-CoA was monitored at 303 nm in quartz cuvettes. These experiments were repeated three times on different days. Unpaired Student's *t*-test was used to analyse if the differences of the slopes corresponding to the decreased absorbance in both conditions (biofilm and planktonic) were statistically significant.

### 2.6.2 | 3-Hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase

The bacterial pellets from biofilm and planktonic states were re-suspended in 100 mM potassium phosphate pH 6.5 buffer containing 0.5 mM PMSF (Sigma) and 1× EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche). The cells were broken using a tip sonicator as it has been described above. To obtain the enough amount of protein, the supernatants were concentrated using an Amicon® Ultra-15 10K (cutoff filter 10 kDa; Merck Millipore Ltd.) and the protein concentration was determined using the Bradford assay (Bio-Rad). This protein extract was used for the 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase activity. This was determined by measuring the decrease in  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide reduced (NADH) absorption at 340 nm (Aboulmaga el et al., 2013). This activity was measured every minute for 1 hr in each experiment. The reaction mixture contained the following: 100 mM potassium phosphate pH 6.5, 1 mM DTT, 350 µg protein extract from biofilm or planktonic and 200 µM  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) (Sigma). The addition of 100 µM acetoacetyl-CoA (MP Biomedicals) initiated the reaction. These experiments were repeated three times on different days. Unpaired Student's *t*-test was used to analyse if the differences of the slopes corresponding to the decreased absorbance in both conditions (biofilm and planktonic) were statistically significant.

## 3 | RESULTS AND DISCUSSION

Before starting these investigations, we obtained the optimal concentration of bacteria and the incubation time of the biofilm using culture techniques and Confocal Laser Scanning Microscopy (Figure S1).

### 3.1 | Proteins differentially expressed in biofilm versus planktonic state

Biofilms developed on coated hydroxyapatite slides provided small quantities of protein that were insufficient for the proteomic analysis. Pooled samples from biofilms and planktonic growth were utilized to obtain enough protein quantity for the proteomic analysis. Three replicates were prepared for each condition for the experiment. Two-dimensional electrophoresis was applied as the proteomic tool to analyse the differential expression of proteins since it allows the direct visualization of the protein maps, thus providing an easier identification of protein isoforms and posttranslational modifications, as well as comparison with other existing protein maps databases (Gorg, Weiss, & Dunn, 2004). The differential protein abundance was compared using the DIGE approach, which involves random labelling the sample with spectrally resolvable fluorescent CyDyes™ (Cy2, Cy3 and Cy5), which provides a high sensitivity. Two samples from a different replicate (Cy3 and Cy5) and an aliquot of the internal standard pool (Cy2) were separated by 2-DE in each of the three gels (Figure 1).

In all, 68 protein spots displayed statistically significant differences [1.5-fold ( $p < .05$ )] in their level of protein expression between biofilm and planktonic growth. These spots were visually confirmed not to be artefacts (Figure 2) and a total of 62 protein spots were excised from the gel. These excised proteins were subjected to trypsin digestion and MS (MALDI-TOF/TOF) study of the corresponding peptide fragments and were identified (Table 1). In Supporting Information Figure S2, the spectra obtained are presented. In total, 62 identified spots rendered 49 unique proteins since several had multiple isoforms (i.e. spots 70, 72, 88 and 89). In some cases (i.e. spots 512, 515 and 525 corresponding to the cysteine synthase, and spots 685 and 699 corresponding to the adenylate kinase), an isoform was overexpressed, while in other/s isoform/s was/were down-expressed (Figure 2). This could be due to the fact that each isoform with defined molecular structure, which could be related to a specific function (D'Amico, Maugeri, Reitano, Cavallaro, & D'Agata, 2016; Martinez-Gomariz et al., 2009). The numbers on the gel Master in Figure 2 correspond with the numbers in Table 1 that represents the identified proteins with their average ratio (biofilm/planktonic); statistical data (*t*-test); GI accession (GenInfo identifier; sequence identification); protein name and MASCOT data (% sequence coverage and protein score). The classification of proteins has been carried out according to their biological function.

There were six non-identified proteins due to the lack of sufficient amount of available protein.

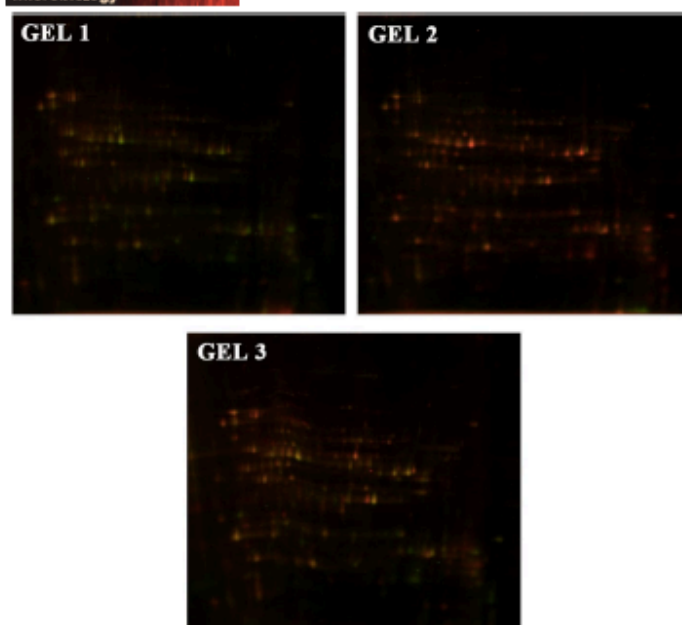


FIGURE 1 2D-DIGE™ analysis identified proteins differentially expressed in biofilm and planktonic states. Cy3 and Cy5 merged images of the 2D-DIGE™: the three gels corresponding with the three biological replicates

### 3.2 | Proteins downregulated in biofilm growth

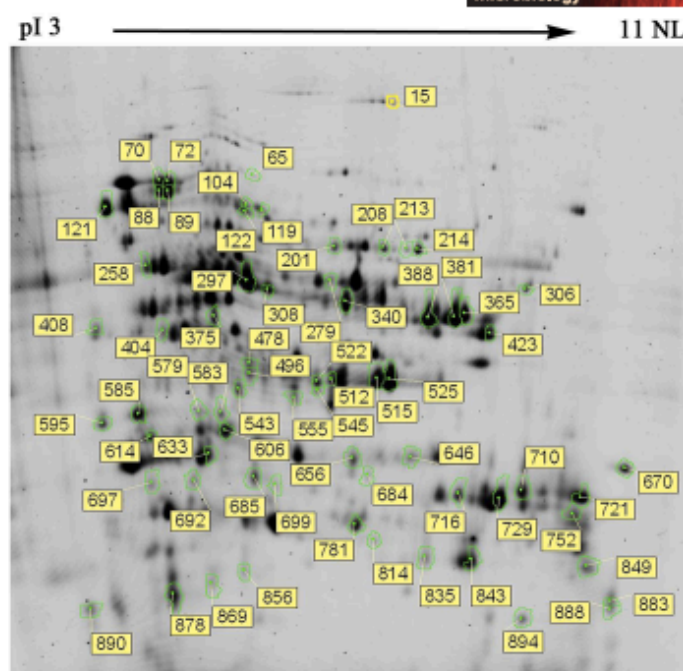
In all, 20 proteins were identified as downregulated from a total of 49 differential proteins (Table 1). Most of these repressed proteins were involved in processes of metabolism and biosynthesis (cofactor, protein, purine, adenosine diphosphate). This fact may be explained since in biofilm growth state, bacteria have a reduced metabolic activity (Donlan & Costerton, 2002; Llama-Palacios et al., 2017; Rathsam, Eaton, Simpson, Browne, Berg, et al., 2005). These results are consistent with other investigations also studying differential protein expression in bacteria growing in biofilms (Llama-Palacios et al., 2017; Pham et al., 2010; Rathsam, Eaton, Simpson, Browne, Valova, et al., 2005). In this investigation, the outer membrane proteins (FomA, OmpA and OmpW) were downexpressed when the bacteria were growing in biofilm state. In other studies, with other bacteria, the opposite behaviour, that is, overexpression of outer membrane proteins has been reported when growing in biofilm (Llama-Palacios et al., 2017; Pham et al., 2010). This may be explained by the different role of outer membrane proteins in *F. nucleatum* biofilms. FomA has been recognized as a major immunogen of *F. nucleatum* (Bakken, Aaro, Hofstad, & Vassstrand, 1989; Mallison, Smith, Schenkein, & Tew, 1991), which acts as a receptor protein for co-aggregation with other oral pathogenic bacteria such as *P. gingivalis* (Kinder & Holt, 1993; Liu et al., 2010). Since these experimental conditions involve the growth of a mono-species biofilm, the lack of co-aggregation with other bacterial species may have repressed the expression of these proteins.

### 3.3 | Proteins overexpressed in biofilm growth

When *F. nucleatum* grew as biofilm, 36 proteins upregulated their expression, which corresponded to 31 unique proteins (Table 1). These were mainly proteins implicated in transport, transcription, translation, in propanediol catabolism and proteins with unknown function.

The upregulation of the proteins implicated in transport may be explained since the sessile bacterial communities can better withstand antimicrobial compounds (such as antibiotics) than their non-attached individual planktonic counterparts (Costerton, Stewart, & Greenberg, 1999); and the efflux system of these substances could be done through the ATP-binding cassette (ABC) transport proteins (Vuotto et al., 2017; Yoon et al., 2015).

Other groups of proteins whose expression was upregulated in *F. nucleatum* biofilm growth were those involved in transcription and translation. Among those in transcription function, we identified the LexA repressor. The LexA regulated SOS network is a bacterial response to DNA damage of metabolic or environmental origin (Walter, Cartman, Minton, Butala, & Rupnik, 2015). LexA also controls several other genes encoding virulence factors (B. M. Walter et al., 2015). This upregulated protein is associated with biofilm formation in different bacteria such as *Clostridium difficile* (Walter et al., 2015), *Clostridium ijundahlii* (Philips, Rabaey, Lovley, & Vargas, 2017) and *Pseudomonas aeruginosa* (Chellappa, Maredia, Phipps, Haskins, & Weitao, 2013). Chellappa et al. have demonstrated the role of LexA repression in motility, which is the initial



event in biofilm development, contributes to the repression of SOS-inducible biofilm formation (Chellappa et al., 2013).

NusG protein is a bacterial transcriptional elongation factor involved in transcription termination and anti-termination. In *Campylobacter jejuni*, it has been described that the *nusG* gene is involved in biofilm formation, since the mutant in this gene has displayed decreased biofilm formation (Teh, Lee, & Dykes, 2017). In *F. nucleatum*, the *nusG* gene has been used as a marker for detecting these bacteria in clinical samples of patients with colorectal cancer (Huang et al., 2016) and could be related to biofilm formation as in *C. jejuni*.

In regard to the proteins involved in translation, the ribosomal proteins L3, L6 and L10 were overexpressed. L6 is required for efficient protein synthesis; thus, it is not surprising that cells with defective L6 would grow slowly (Proctor et al., 2014). Since these proteins have been assigned a specific role in resistance to antimicrobial agents (Buckel, Buchberger, Bock, & Wittmann, 1977; Klitgaard et al., 2015; Proctor et al., 2014) and in ability to adapt to stress (Castro et al., 2015), we have hypothesized that their upregulation in biofilm growth may explain the higher resistance to antimicrobial compounds in this growth state (Stewart & Costerton, 2001).

About the proteins involved in the catabolism of propanediol, the *pdu* operon is part of a metabolic pathway involved in the metabolism of fucose (Walter, Ailion, & Roth, 1997). The ability to metabolize fucose (a major component of intestinal mucus) has been

associated with the virulence of enteropathogenic bacteria, since it provides a competitive advantage for intestinal invasion, colonization and persistence within macrophages (Adkins et al., 2006). Since several authors have suggested that the expression of Pdu proteins contributes to the pathogenesis of some bacteria (Adkins et al., 2006; Dogan et al., 2014) and it is correlated with increased cellular invasion (Dogan et al., 2014), probably, the overexpression of these proteins in *F. nucleatum* when it is growing as a biofilm could justify its increased ability to colonize the different tissues where we can find the bacteria.

From the detected upregulated proteins in the biofilm growth, those with unknown function represented almost 20%.

### 3.4 | Proteins of the butyrate pathway with differential expression

The production of butyric acid as a major product of the fermentation of glucose and peptone, together with characteristic lipid constituents, differentiates *Fusobacterium* species from other anaerobic, gram-negative, non-spore forming rods (Bolzstad et al., 1996). The synthesis of butyrate from pyruvate in *F. nucleatum* using the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (Ogata et al., 1999) metabolic pathway database is represented in Figure 3.

TABLE 1 Value Proteins differentially expressed in *F. nucleatum* in biofilms and planktonic states

Master gel no.	GI Accession	Protein name	Biofilm/ Planktonic		% Sequence coverage	Protein score
			t-Test	Av. ratio		
Metabolism						
522	254302735	Fructose-bisphosphate aldolase	0.00014	5.85	64	532
856	254303269	Protein-N(pil)-phosphohistidine sugar phosphotransferase	0.00077	4.9	50	90
545	254302735	Fructose-bisphosphate aldolase	0.0027	3.94	39	219
633	254304335	Triose-phosphate isomerase	0.0015	1.83	75	477
375	254303335	Zinc-dependent alcohol dehydrogenase	0.024	1.67	40	157
340	254302983	Acetate kinase	0.044	1.53	66	200
88	254302597	Glutaconyl-CoA decarboxylase	0.000044	-2.8	42	192
70	254302597	Glutaconyl-CoA decarboxylase	0.0014	-2.67	57	257
72	254302597	Glutaconyl-CoA decarboxylase	0.00065	-2.64	49	224
478	254302700	Transketolase	0.003	-2.42	60	274
89	254302597	Glutaconyl-CoA decarboxylase	0.0032	-2.07	62	302
258	254303536	Phosphopyruvate hydratase	0.0031	-1.75	60	243
201	254303334	Lysine 2,3-aminomutase	0.0075	-1.64	42	113
Butyrate pathway						
15	355370490	Pyruvate: ferredoxin (flavodoxin) oxidoreductase	0.015	2.41	31	195
308	254303809	Electron transfer flavoprotein alpha subunit	0.0047	2.16	52	201
423	254303807	Butyryl-CoA dehydrogenase	0.031	2.06	68	225
381	254304092	Acetyl-CoA acetyltransferase	0.000013	1.98	59	221
297	254303809	Electron transfer flavoprotein alpha subunit	0.023	1.69	51	244
388	254304092	Acetyl-CoA acetyltransferase	0.0023	1.61	75	254
579	254303150	3-hydroxybutyryl-CoA dehydratase	0.0039	-2.64	35	260
555	254303151	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	0.019	-1.64	37	425
Cellular processes, chaperones						
869	254302755	Peptidylprolyl cis-trans isomerase (rotamase)	0.0026	3.67	28	184
121	254302273	FKBP-type peptidylprolyl cis-trans isomerase (trigger factor)	0.00085	-1.63	61	267
Purine biosynthesis						
213	254302919	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	0.0026	-2.27	32	121
208	254302919	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	0.0055	-1.56	43	354
214	254302919	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	0.015	-1.55	47	165
Protein biosynthesis						
585	19704055	Elongation factor P	0.000012	4.09	43	343
404	254303393	Elongation factor EF1B	0.029	-1.81	64	204
408	254303393	Elongation factor EF1B	0.019	-1.56	64	204
Cofactor biosynthesis						
496	254303958	Pyridoxine biosynthesis	0.0032	-2.15	50	298
Amino acid biosynthesis						
525	254303900	Cysteine synthesis	0.0036	1.88	95	420
512	254303900	Cysteine synthesis	0.0036	-2.17	64	491
515	254303900	Cysteine synthesis	0.0069	-1.9	91	318
ADP biosynthesis						

(Continues)



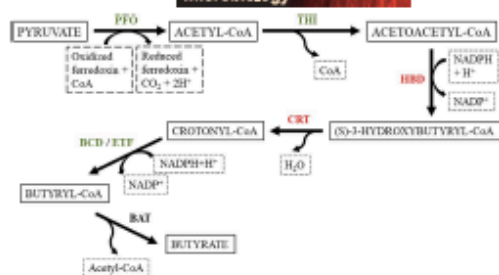
TABLE 1 (Continued)

Master gel no.	GI Accession	Protein name	Biofilm/ Planktonic		% Sequence coverage	Protein score
			t-Test	Av. ratio		
685	254302850	Adenylate kinase	0.0066	3.62	56	121
699	254302850	Adenylate kinase	0.015	-3.56	38	116
Transport						
646	254303574	Cation ABC superfamily ATP-binding cassette transporter	0.00019	5.47	53	223
721	254303634	ABC superfamily ATP-binding cassette transporter	0.00043	4.29	46	107
752	254302964	Amino acid ABC superfamily ATP-binding cassette transporter	0.0056	2.17	56	217
595	254302678	ABC superfamily ATP-binding cassette transporter	0.0098	-1.89	61	226
Transcription						
692	254302296	NusG transcription anti-termination protein	0.000018	5.36	61	144
656	254302132	LexA repressor	0.0024	3.09	21	122
Translation						
883	254303405	Ribosomal protein L6	0.0013	6.86	71	204
670	254303420	Ribosomal protein L3	0.00041	3.24	70	138
849	254302293	Ribosomal protein L10	0.0023	1.84	82	197
OMP						
894	254303591	OmpW possible outer membrane protein	0.0011	-2.68	54	153
365	254303326	Porin FomA	0.0062	-1.56	58	270
878	254302656	OmpA family outer membrane protein	0.041	-1.55	67	122
Response to external stimulus						
716	254302069	Propanediol dehydratase medium subunit	0.0025	6.82	54	404
606	254302068	Propanediol utilization protein PduB	0.019	1.53	72	164
Oxidative stress						
697	254302236	Peroxiredoxin	0.00031	-5.2	65	136
Glutamate catabolism						
684	254302599	R-2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase activator	0.0019	2.97	41	184
279	254304080	Glutamate dehydrogenase	0.015	-2.52	35	155
Unknown protein						
843	254303079	Hypothetical protein FNP_0718	0.0007	7.74	69	171
835	254303079	Hypothetical protein FNP_0718	0.0025	6.2	42	144
781	254302602	Hypothetical protein FNP_0229	0.0014	3.61	67	154
729	254302369	Hypothetical protein FNP_2425	0.015	2.29	57	182
543	254303862	Hypothetical protein FNP_1523	0.0015	2.17	32	86
710	254302455	Hypothetical protein FNP_0078	0.015	2.15	18	107
306	254302084	Hypothetical protein FNP_2131	0.0078	1.86	18	83
814	254304050	Hypothetical protein FNP_1719	0.0016	1.56	33	108
614	254302665	Hypothetical protein FNP_0293	0.00018	-3.68	38	153
890	254303559	Hypothetical protein FNP_1215	0.012	-2.92	60	152

Average ratios and Student's *t*-test *p* values are calculated using Decyder™ software v6.5.

Of the seven enzymes involved in this pathway, six were differentially expressed when growing as biofilm versus planktonic: (a) pyruvate:ferredoxin (flavodoxin) oxidoreductase (PFO), acetyl-CoA acetyltransferase (thiolase, THI), and the complex butyryl-CoA

dehydrogenase (BCD) and electron transfer flavoprotein alpha subunit (ETF) were overexpressed; while (b) 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase (HBD) and 3-hydroxybutyryl-CoA dehydratase (crotonase, CRT) were downexpressed (Figure 3). Since practically the



**FIGURE 3** The butyrate pathway from pyruvate in *F. nucleatum* using the KEGG metabolic pathway database. Green names of proteins indicate those that are overexpressed in biofilm versus planktonic state, and red names of proteins indicate those that are downexpressed in biofilm versus planktonic state. PFO, pyruvate:ferredoxin (flavodoxin) oxidoreductase; THI, acetyl-CoA acetyltransferase (thiolase); HBD, 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase; CRT, 3-hydroxybutyryl-CoA dehydratase (crotonase); BCD, butyryl-CoA dehydrogenase; ETF, electron transfer flavoprotein alpha subunit; BAT, butyrate-acetoacetate CoA-transferase subunit B

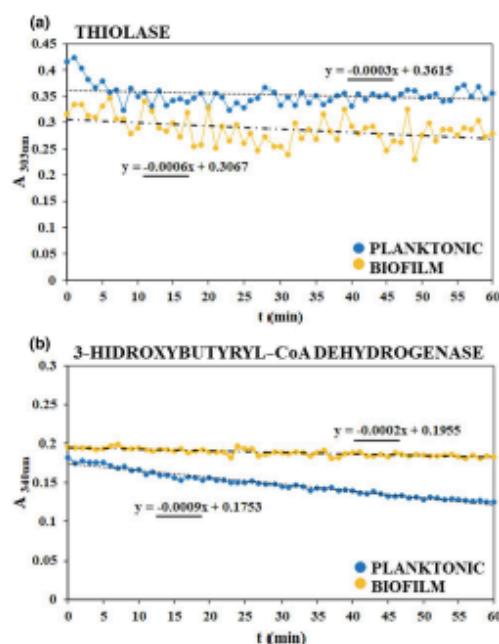
whole pathway is regulated by the state of growth (biofilm or planktonic) in which bacteria are found, we think that this differential expression may be important for the biofilm formed by the bacteria and ultimately for its virulence.

The activity of the acetyl-CoA acetyltransferase (thiolase) and the activity of the 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase, which were overexpressed and downexpressed in the biofilm, respectively, were analysed spectrophotometrically as described in the experimental section. In each experiment, the negative slope corresponding to the decrease in absorbance at 303 nm was calculated for the thiolase activity; and the negative slope (in negative) corresponding to the decrease in the absorbance at 340 nm was calculated for the 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase activity. A representative graph of each enzymatic activity in both growth conditions was presented in Figure 4, where the slope was calculated from the linear trend estimation.

With the data obtained from the slopes of each of the graphs of the two enzymatic assays, analysed in both growth states (biofilm or planktonic), the mean and standard deviation were calculated as indicated in Table 2.

These results demonstrated the significant increased thiolase activity and decreased 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase activity, which highlights the differences in protein expression of this bacterium in biofilm state when compared to planktonic state. For *Tannerella forsythia*, the butyrate production pathway was markedly downregulated in biofilms, but in this case, the bacteria produce this metabolite as an end-product of glutamate and aspartate metabolism (Pham et al., 2010).

Jorth et al. used patient-matched healthy and diseased samples to compare gene expression of 160,000 genes in healthy and diseased periodontal communities. They revealed that specific



**FIGURE 4** Representative graph of enzymatic activity in both growth conditions of (a) thiolase (acetyl-CoA acetyltransferase). This is determined in the thiolytic direction with acetoacetyl-CoA as substrate by monitoring the decrease in absorbance at 303 nm every minute for 1 hr. Planktonic, Biofilm. The slope is calculated from the linear trend estimation. (b) 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase. This is determined by measuring the decrease in  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide reduced (NADH) absorption at 340 nm every minute for 1 hr. Planktonic, Biofilm. The slope is calculated from the linear trend estimation

pathways showed enhanced gene expression in all diseased sites included lysine fermentation to butyrate, and pyruvate fermentation, and these pathways were reported as important in disease-associated populations hence likely contributing to the disease process (Jorth et al., 2014). These authors attributed *F. nucleatum* as a key-stone species during periodontitis by shifting its gene expression to produce a metabolite (butyrate) that established a favourable growth environment for the disease-associated bacterial community (Jorth et al., 2014), and their results recapitulated a key phenomenon consistently found during the onset and progression of periodontal diseases: the increased production of short-chain fatty acids such as butyrate (Jorth et al., 2014). On the other hand, high butyrate levels have been associated to periodontitis, and in vivo high concentrations of propionic and butyric acid have been identified in the gingival crevice of subjects with periodontitis (Niederman, Buyle-Bodin, Lu, Robinson, & Naleway, 1997). Also, it was described that butyrate and propionate, end products of dental plaque metabolism, may have an aetiological role in periodontal diseases (Singer &

**TABLE 2** Value of the slope corresponding to the decrease in absorbance in the enzymatic assays of thiolase and  $\beta$ -hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase from *F. nucleatum* in the biofilm and the planktonic states

Growth status	Total protein ( $\mu$ g)	$\Delta A_{303nm}$ (slope) mean (SD) <sup>a</sup>
<b>Thiolase</b>		
Biofilm	500	$-5.67 \times 10^{-4}$ ( $5.77 \times 10^{-5}$ )
Planktonic	500	$-3.33 \times 10^{-4}$ ( $5.77 \times 10^{-5}$ )
<b><math>\beta</math>-Hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase</b>		
Biofilm	350	$-2.33 \times 10^{-4}$ ( $5.77 \times 10^{-5}$ )
Planktonic	350	$-8.00 \times 10^{-4}$ ( $1.00 \times 10^{-4}$ )

Abbreviation: SD, standard deviation.

<sup>a</sup>In all cases, differences between biofilm and planktonic states were statistically significant according to the Student's *t*-test ( $p < .05$ ).

Buckner, 1981). Butyrate induces reactive oxygen species production and affects cell cycle progression of human gingival fibroblasts (Bartold, Gully, Zilm, & Rogers, 1991; Chang et al., 2013), and inhibit lymphocyte proliferation and cytokine production (Kurita-Ochiai, Fukushima, & Ochiai, 1995). All these factors may link the results of this investigation with the pathogenicity of *F. nucleatum* when growing in biofilm state.

It is also known that *F. nucleatum* is part of the gut microbiota and maintains intestinal homeostasis by regulating various biological activities such as mucosal barrier, immune and metabolic functions (Holmes, Li, Marchesi, & Nicholson, 2012). Different studies have reported that *F. nucleatum* was found in higher concentrations in samples from colorectal cancer compared to healthy controls (Castellari et al., 2012; Kostic et al., 2012, 2013; Mira-Pascual et al., 2015), and mechanistic studies have demonstrated the pathogenic role of *F. nucleatum* in the development of colorectal cancer and its progression (Castellari et al., 2012; Flanagan et al., 2014; Gholizadeh et al., 2017; Kostic et al., 2013; Rubinstein et al., 2013). It seems that *F. nucleatum* proves favourable to the colorectal tumours through the releasing of short-chain fatty acids as butyrate in the tumour microenvironment that serve as chemo-attractants for myeloid-derived suppressor cells (Bashir, Miskeen, Hazari, Asrafuzzaman, & Fazili, 2016). Infiltration of these suppressor-immune cells and subsequent release of their effectors within the appropriate tumour microenvironment may favour the colorectal tumorigenesis (Bashir et al., 2016). Furthermore, butyrate has a key role in maintaining gut homeostasis and epithelial integrity, since it serves as the main energy source for colonocytes, and plays a critical role in health and disease (Vital, Howe, & Tiedje, 2014). Butyrate is synthesized via pyruvate and acetylcoenzyme A, mostly by the breakdown of complex polysaccharides (e.g. starch and xylan) that escape digestion in the upper gastrointestinal tract and reach the colon (Louis & Flint, 2009).

Additionally, there are other known butyrate-producing pathways, namely, the lysine, glutarate and 4-aminobutyrate pathways, where amino acids serve as major substrates (Vital et al., 2014). Butyrate synthesis was shown to be influenced by several factors, such as type of limiting substrate and growth rate (Macfarlane & Macfarlane, 2003), oxygen concentration (Khan et al., 2012) and growth style (Macfarlane & Macfarlane, 2006).

All this information, together with the differential expression of the enzymes that are part of the butyrate pathway when *F. nucleatum* forms biofilms, seem to indicate the importance of the virulence of this bacterium in both periodontal diseases and human colorectal carcinomas.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Extraordinary Chair DENTAID in Periodontal Research (University Complutense of Madrid, Spain). A. Llama-Palacios and M.C. Sánchez received funding from Extraordinary Chair DENTAID in Periodontal Research. O. Potupa received funding from the Clinical Research Foundation (CRF) for the Promotion of Oral Health (Brienz, Switzerland). DIGE and mass spectrometry analysis were carried out in the Proteomics Facility University Complutense of Madrid (Spain), a member of ProteoRed-ISCIII network.


#### CONFLICT OF INTEREST


The authors declare no competing financial interest.

#### PEER REVIEW

The peer review history for this article is available at <https://publons.com/publon/10.1111/mom.12303>.

#### ORCID

Aranha Llama-Palacios  <https://orcid.org/0000-0001-6486-0120>

Elena Figueroa  <https://orcid.org/0000-0002-3129-1416>

David Herrera  <https://orcid.org/0000-0002-5554-2777>

Mariano Sanz  <https://orcid.org/0000-0002-6293-5755>

#### REFERENCES

- Aboulnaga el, H., Pinkenburg, O., Schiffels, J., El-Refai, A., Buckel, W., & Selmer, T. (2013). Effect of an oxygen-tolerant bifurcating butyryl coenzyme A dehydrogenase/electron-transferring flavoprotein complex from *Clostridium difficile* on butyrate production in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 195(16), 3704–3713. <https://doi.org/10.1128/JB.00321-13>
- Adkins, J. N., Mottaz, H. M., Norbeck, A. D., Gustin, J. K., Rue, J., Clauss, T. R., ... Smith, R. D. (2006). Analysis of the *Salmonella typhimurium* proteome through environmental response toward infectious conditions. *Molecular & Cellular Proteomics*, MCP, 5(8), 1450–1461. <https://doi.org/10.1074/mcp.M600139-MCP200>
- Athavale, N. V., Leitch, D. G., & Cowling, P. (2002). Liver abscesses due to *Fusobacterium* spp that mimic malignant metastatic liver disease. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 21(12), 884–886. <https://doi.org/10.1007/s10096-002-0844-8>
- Bakken, V., Aaro, S., Hofstad, T., & Vasstrand, E. N. (1989). Outer membrane proteins as major antigens of *Fusobacterium nucleatum*.



- FEMS Microbiology Immunology, 1(8–9), 473–483. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1989.tb02438.x>
- Bartold, P. M., Gully, N. J., Zilm, P. S., & Rogers, A. H. (1991). Identification of components in *Fusobacterium nucleatum* chemostat-culture supernatants that are potent inhibitors of human gingival fibroblast proliferation. *Journal of Periodontal Research*, 26(4), 314–322. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1831499>. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1991.tb02069.x>
- Bashir, A., Miskeen, A. Y., Hazari, Y. M., Asrafuzzaman, S., & Fazili, K. M. (2016). *Fusobacterium nucleatum*, inflammation, and immunity: The fire within human gut. *Tumour Biology*, 37(3), 2805–2810. <https://doi.org/10.1007/s12277-015-4724-0>
- Bennett, K. W., & Eley, A. (1993). *Fusobacteriaz*: New taxonomy and related diseases. *Journal of Medical Microbiology*, 39(4), 246–254. <https://doi.org/10.1099/00222615-39-4-246>
- Bolstad, A. I., Jensen, H. B., & Bakken, V. (1996). Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. *Clinical Microbiology Reviews*, 9(1), 55–71. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8665477>. <https://doi.org/10.1128/CMR.9.1.55>
- Bradshaw, D. J., & Marsh, P. D. (1998). Analysis of pH-driven disruption of oral microbial communities in vitro. *Caries Research*, 32(6), 456–462. <https://doi.org/10.1159/000016487>
- Brook, I., & Walker, R. I. (1986). The relationship between *Fusobacterium* species and other flora in mixed infection. *Journal of Medical Microbiology*, 21(2), 93–100. <https://doi.org/10.1099/00222615-21-2-93>
- Buckel, P., Buchberger, A., Bock, A., & Wittmann, H. G. (1977). Alteration of ribosomal protein L6 in mutants of *Escherichia coli* resistant to gentamicin. *Molecular and General Genetics*, 158(1), 47–54. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/342908>. <https://doi.org/10.1007/BF00455118>
- Castellari, M., Warren, R. L., Freeman, J. D., Dreolini, L., Krzywinski, M., Strauss, J., ... Holt, R. A. (2012). *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Research*, 22(2), 299–306. <https://doi.org/10.1101/gr.126516.111>
- Castro, D., Cordeiro, I. B., Taquita, P., Eberlin, M. N., Garcia, J. S., Souza, G. H. M. F., ... Orlando, P. P. (2015). Proteomic analysis of *Chromobacterium violaceum* and its adaptability to stress. *BMC Microbiology*, 15, 272. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0606-2>
- Chang, M.-C., Tsai, Y.-L., Chen, Y.-W., Chan, C.-P., Huang, C.-F., Lan, W.-C., ... Jeng, J.-H. (2013). Butyrate induces reactive oxygen species production and affects cell cycle progression in human gingival fibroblasts. *Journal of Periodontal Research*, 48(1), 66–73. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2012.01504.x>
- Chellappa, S. T., Maredia, R., Phipps, K., Haskins, W. E., & Weitao, T. (2013). Motility of *Pseudomonas aeruginosa* contributes to SOS-inducible biofilm formation. *Research in Microbiology*, 164(10), 1019–1027. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.10.001>
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318–1322. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
- D'Amico, A. G., Maugeri, G., Reitano, R., Cavallaro, S., & D'Agata, V. (2016). Proteomic analysis of parkin isoforms expression in different rat brain areas. *Protein Journal*, 35(5), 354–362. <https://doi.org/10.1007/s10930-016-9679-5>
- Dogan, B., Suzuki, H., Herlekar, D., Sartor, R. B., Campbell, B. J., Roberts, C. L., ... Simpson, K. W. (2014). Inflammation-associated adherent-invasive *Escherichia coli* are enriched in pathways for use of propionate and iron and M-cell translocation. *Inflammatory Bowel Diseases*, 20(11), 1919–1932. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000183>
- Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167–193. <https://doi.org/10.1128/cmr.15.2.167-193.2002>
- Flanagan, L., Schmid, J., Ebert, M., Soucek, P., Kunicka, T., Liska, V., ... Hughes, D. J. (2014). *Fusobacterium nucleatum* associates with stages of colorectal neoplasia development, colorectal cancer and disease outcome. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 33(8), 1381–1390. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2081-3>
- Gholizadeh, P., Eslami, H., & Kafili, H. S. (2017). Carcinogenesis mechanisms of *Fusobacterium nucleatum*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 89, 918–925. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.02.102>
- Gorg, A., Weiss, W., & Dunn, M. J. (2004). Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, 4(12), 3665–3685. <https://doi.org/10.1002/pmic.200401031>
- Gupta, A., Govila, V., & Saini, A. (2015). Proteomics - The research frontier in periodontics. *J Oral Biol Craniofac Res*, 5(1), 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.01.001>
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 95–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicr0821>
- Hartmanis, M. G., & Gatenbeck, S. (1984). Intermediary metabolism in *Clostridium acetobutylicum*: Levels of enzymes involved in the formation of acetate and butyrate. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(6), 1277–1283. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16346566>. <https://doi.org/10.1128/AEM.47.6.1277-1283.1984>
- Holmes, E., Li, J. V., Marchesi, J. R., & Nicholson, J. K. (2012). Gut microbiota composition and activity in relation to host metabolic phenotype and disease risk. *Cell Metabolism*, 16(5), 559–564. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.10.007>
- Huang, S., Yang, Z., Zou, D., Dong, D., Liu, A., Liu, W., & Huang, L. (2016). Rapid detection of *nusG* and *fadA* in *Fusobacterium nucleatum* by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Medical Microbiology*, 65(8), 760–769. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000300>
- Jorth, P., Turner, K. H., Gumus, P., Nizam, N., Buduneli, N., & Whiteley, M. (2014). Metatranscriptomics of the human oral microbiome during health and disease. *MBio*, 5(2), e01012-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01012-14>
- Khan, M. T., Duncan, S. H., Stams, A. J., van Dijk, J. M., Flint, H. J., & Harmsen, H. J. (2012). The gut anaerobe *Faecalibacterium prausnitzii* uses an extracellular electron shuttle to grow at oxic-anoxic interfaces. *ISME Journal*, 6(8), 1578–1585. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.5>
- Kinder, S. A., & Holt, S. C. (1993). Localization of the *Fusobacterium nucleatum* T18 adhesin activity mediating coaggregation with *Porphyromonas gingivalis* T22. *Journal of Bacteriology*, 175(3), 840–850. <https://doi.org/10.1128/jb.175.3.840-850.1993>
- Klitgaard, R. N., Ntoku, E., Nørgaard, K., Biltoft, D., Hansen, L. H., Trædholm, N. M., ... Vester, B. (2015). Mutations in the bacterial ribosomal protein I3 and their association with antibiotic resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(6), 3518–3528. <https://doi.org/10.1128/AAC.00179-15>
- Kolenbrander, P. E., & London, J. (1993). Adhere today, here tomorrow: Oral bacterial adherence. *Journal of Bacteriology*, 175(11), 3247–3252. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8501028>. <https://doi.org/10.1128/JB.175.11.3247-3252.1993>
- Kostic, A. D., Chun, E., Robertson, L., Glickman, J. N., Gallini, C. A., Michaud, M., ... Garrett, W. S. (2013). *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell Host & Microbe*, 14(2), 207–215. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.07.007>
- Kostic, A. D., Gevers, D., Pedamallu, C. S., Michaud, M., Duke, F., Earl, A. M., ... Meyerson, M. (2012). Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Research*, 22(2), 292–298. <https://doi.org/10.1101/gr.126573.111>
- Kostic, A. D., Xavier, R. J., & Gevers, D. (2014). The microbiome in inflammatory bowel disease: Current status and the future ahead.

- Gastroenterology, 146(6), 1489–1499. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.02.009>
- Kurita-Ochiai, T., Fukushima, K., & Ochiai, K. (1995). Volatile fatty acids, metabolic by-products of periodontopathic bacteria, inhibit lymphocyte proliferation and cytokine production. *Journal of Dental Research*, 74(7), 1367–1373. <https://doi.org/10.1177/00220345950740070801>
- Liu, P. F., Shi, W., Zhu, W., Smith, J. W., Hsieh, S. L., Gallo, R. L., & Huang, C. M. (2010). Vaccination targeting surface FomA of *Fusobacterium nucleatum* against bacterial co-aggregation: Implication for treatment of periodontal infection and halitosis. *Vaccine*, 28(19), 3496–3505. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.02.047>
- Llama-Palacios, A., Potupa, O., Sanchez, M. C., Figuero, E., Herrera, D., & Sanz, M. (2017). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* growth in biofilm versus planktonic state: Differential expression of proteins. *Journal of Proteome Research*, 16(9), 3158–3167. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00127>
- Louis, P., & Flint, H. J. (2009). Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiology Letters*, 294(1), 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01514.x>
- Macfarlane, S., & Macfarlane, G. T. (2003). Regulation of short-chain fatty acid production. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 62(1), 67–72. <https://doi.org/10.1079/PNS20020207>
- Macfarlane, S., & Macfarlane, G. T. (2006). Composition and metabolic activities of bacterial biofilms colonizing food residues in the human gut. *Applied and Environment Microbiology*, 72(9), 6204–6211. <https://doi.org/10.1128/AEM.00754-06>
- Mallison, S. M. 3rd, Smith, J. P., Schenkein, H. A., & Tew, J. G. (1991). Accumulation of plasma cells in inflamed sites: Effects of antigen, nonspecific microbial activators, and chronic inflammation. *Infection and Immunity*, 59(11), 4019–4025. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1937760>. <https://doi.org/10.1128/IAI.59.11.4019-4025.1991>
- Martinez-Gomaz, M., Perumal, P., Mekala, S., Nombela, C., Chaffin, W. L., & Gil, C. (2009). Proteomic analysis of cytoplasmic and surface proteins from yeast cells, hyphae, and biofilms of *Candida albicans*. *Proteomics*, 9(8), 2230–2252. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700594>
- McCoy, A. N., Araujo-Perez, F., Azcarate-Peril, A., Yeh, J. J., Sandler, R. S., & Keku, T. O. (2013). *Fusobacterium* is associated with colorectal adenomas. *PLoS One*, 8(1), e53653. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053653>
- Mira-Pascual, L., Cabrera-Rubio, R., Ocon, S., Costales, P., Parra, A., Suarez, A., ... Collado, M. C. (2015). Microbial mucosal colonic shifts associated with the development of colorectal cancer reveal the presence of different bacterial and archaeal biomarkers. *Journal of Gastroenterology*, 50(2), 167–179. <https://doi.org/10.1007/s00535-014-0963-x>
- Mitsuhashi, K., Noshio, K., Sukawa, Y., Matsunaga, Y., Ito, M., Kurihara, H., ... Shinomura, Y. (2015). Association of *Fusobacterium* species in pancreatic cancer tissues with molecular features and prognosis. *Oncotarget*, 6(9), 7209–7220. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3109>
- Niederman, R., Buyle-Bodin, Y., Lu, B. Y., Robinson, P., & Naleway, C. (1997). Short-chain carboxylic acid concentration in human gingival crevicular fluid. *Journal of Dental Research*, 76(1), 575–579. <https://doi.org/10.1177/00220345970760010801>
- Ogata, H., Goto, S., Sato, K., Fujibuchi, W., Bono, H., & Kanehisa, M. (1999). KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 27(1), 29–34. <https://doi.org/10.1093/nar/27.1.29>
- Pham, T. K., Roy, S., Noirel, J., Douglas, I., Wright, P. C., & Stafford, G. P. (2010). A quantitative proteomic analysis of biofilm adaptation by the periodontal pathogen *Tannerella forsythia*. *Proteomics*, 10(17), 3130–3141. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900448>
- Philips, J., Rabaey, K., Lovley, D. R., & Vargas, M. (2017). Biofilm formation by *Clostridium ljungdahlii* is induced by sodium chloride stress: Experimental evaluation and transcriptome analysis. *PLoS One*, 12(1), e0170406. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170406>
- Proctor, R. A., Kriesekorte, A., Kahl, B. C., Becker, K., Löffler, B., & Peters, G. (2014). *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants (SCVs): A road map for the metabolic pathways involved in persistent infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4, 99. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00099>
- Rathsam, C., Eaton, R. E., Simpson, C. L., Browne, G. V., Berg, T., Hart, D. W., & Jacques, N. A. (2005). Up-regulation of competence- but not stress-responsive proteins accompanies an altered metabolic phenotype in *Streptococcus mutans* biofilms. *Microbiology*, 151(Pt 6), 1823–1837. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27830-0>
- Rathsam, C., Eaton, R. E., Simpson, C. L., Browne, G. V., Valova, V. A., Hart, D. W., & Jacques, N. A. (2005). Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoretic analysis of *Streptococcus mutans* biofilms. *Journal of Proteome Research*, 4(6), 2161–2173. <https://doi.org/10.1021/pr0502471>
- Resch, A., Leicht, S., Saric, M., Pasztor, L., Jakob, A., Gotz, F., & Nordheim, A. (2006). Comparative proteome analysis of *Staphylococcus aureus* biofilm and planktonic cells and correlation with transcriptome profiling. *Proteomics*, 6(6), 1867–1877. <https://doi.org/10.1002/pmic.200500531>
- Rubinstein, M. R., Wang, X., Liu, W., Hao, Y., Cai, G., & Han, Y. W. (2013). *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/beta-catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell Host & Microbe*, 14(2), 195–206. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.07.012>
- Sauer, K. (2003). The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biology*, 4(6), 219. <https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-6-219>
- Sechi, S., & Chait, B. T. (1998). Modification of cysteine residues by alkylation. A tool in peptide mapping and protein identification. *Analytical Chemistry*, 70(24), 5150–5158. <https://doi.org/10.1021/ac9806005>
- Shang, F. M., & Liu, H. L. (2018). *Fusobacterium nucleatum* and colorectal cancer: A review. *World J Gastrointest Oncol*, 10(3), 71–81. <https://doi.org/10.4251/wjgo.v10.i3.71>
- Signat, B., Roques, C., Poulet, P., & Duffaut, D. (2011). *Fusobacterium nucleatum* in periodontal health and disease. *Current Issues in Molecular Biology*, 13(2), 25–36. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21220789>
- Singer, R. E., & Buckner, B. A. (1981). Butyrate and propionate: Important components of toxic dental plaque extracts. *Infection and Immunity*, 32(2), 458–463. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/725113210.1128/IAI.32.2.458-463.1981>
- Stern, J. R. (1956). Optical properties of acetoacetyl-S-coenzyme A and its metal chelates. *Journal of Biological Chemistry*, 221(1), 33–44. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13345796>
- Stewart, P. S., & Costerton, J. W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*, 358(9276), 135–138. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(01\)05321-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(01)05321-1)
- Teh, A. H. T., Lee, S. M., & Dykes, G. A. (2017). Identification of potential *Campylobacter jejuni* genes involved in biofilm formation by EZ-Tn5 Transposome mutagenesis. *BMC Research Notes*, 10(1), 182. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2504-1>
- Vital, M., Howe, A. C., & Tiedje, J. M. (2014). Revealing the bacterial butyrate synthesis pathways by analyzing (meta)genomic data. *MBio*, 5(2), e00889. <https://doi.org/10.1128/mBio.00889-14>
- Vuotto, C., Longo, F., Pascolini, C., Donelli, G., Balice, M. P., Libori, M. F., ... Varaldo, P. E. (2017). Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. *Journal of Applied Microbiology*, 123(4), 1003–1018. <https://doi.org/10.1111/jam.13533>

- Walter, B. M., Cartman, S. T., Minton, N. P., Butala, M., & Rupnik, M. (2015). The SOS response master regulator LexA is associated with sporulation, motility and biofilm formation in *Clostridium difficile*. *PLoS One*, 10(12), e0144763. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144763>
- Walter, D., Ailion, M., & Roth, J. (1997). Genetic characterization of the pdu operon: Use of 1,2-propanediol in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, 179(4), 1013–1022. <https://doi.org/10.1128/jb.179.4.1013-1022.1997>
- Yoon, E. J., Chabane, Y. N., Goussard, S., Sniesrud, E., Courvalin, P., De, E., & Grillot-Courvalin, C. (2015). Contribution of resistance-nodulation-cell division efflux systems to antibiotic resistance and biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *Mbio*, 6(2), 1–13. <https://doi.org/10.1128/mbio.00309-15>

#### SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: Llama-Palacios A, Potupa O, Sánchez MC, Figuero E, Herrera D, Sanz M. Proteomic analysis of *Fusobacterium nucleatum* growth in biofilm versus planktonic state. *Mol Oral Microbiol*. 2020;35:168–180. <https://doi.org/10.1111/omi.12303>

### III. Comité ético



Hospital Clínico San Carlos

Comunidad de Madrid

Informe Dictamen Protocolo Favorable

C.I. 19/209-E

08 de mayo de 2019

CEIC Hospital Clínico San Carlos

Dra. Mar García Arenillas  
Presidenta del CEIC Hospital Clínico San Carlos

#### CERTIFICA

Que el CEIC Hospital Clínico San Carlos en su reunión del día 24/04/2019, acta 4.2/19 ha evaluado la propuesta del promotor/investigador referida al estudio:

**Título: "Análisis de la respuesta serológica de individuos con periodontitis e individuos sanos frente a proteínas de membrana externa de bacterias periodontales"**

**Código Interno: 19/209-E**

Que en este estudio:

- o Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- o La capacidad del investigador y los medios disponibles son adecuados para llevar a cabo el estudio.
- o El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto de los postulados éticos.
- o Se cumplen los preceptos éticos formulados en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica mundial sobre principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos y en sus posteriores revisiones, así como aquellos exigidos por la normativa legal aplicable en función de las características del estudio.

Es por ello que el Comité **informa favorablemente** sobre la realización de dicho proyecto por el Dr. Mariano Sanz Alonso. Facultad de Odontología de la U.C.M.

Lo que firmo en Madrid, a 08 de mayo de 2019

Dra. Mar García Arenillas  
Presidenta del CEIC Hospital Clínico San Carlos